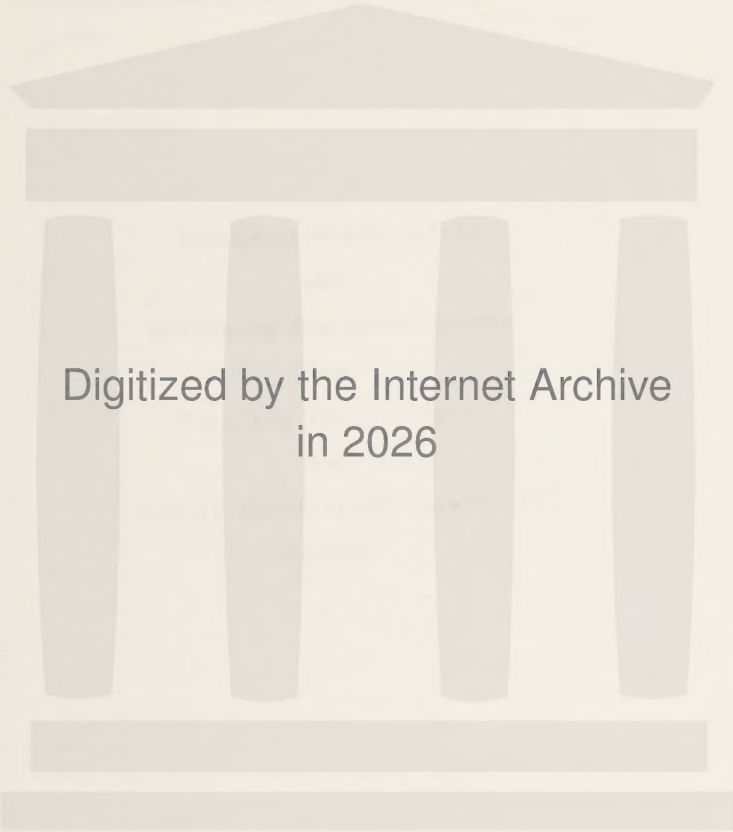


**Der Einfluß von organischen Säuren
und von Sauerstoff auf die Gär-und
Energiebilanz von Leuconostoc und
verschiedener Lactobacillen**

Josef Winter
—

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Der Einfluß von organischen Säuren und von Sauer-
stoff auf die Gär- und Energiebilanz von Leuco-
nostoc und verschiedener Lactobacillen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Josef Winter
aus
Nasnitz

Juli 1974



1. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler
2. Berichterstatter: Prof.Dr.K.H.Schleifer

Tag der Einreichung der Arbeit: 5.7.1974

Tag der mündlichen Prüfung: 1.8.1974

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
I. Der Malatabbau durch Lactobacillen	1
II. Der "molare ökonomische Koeffizient" bei Lactobacillen	5
B. Material und Methoden	11
1. Organismen	11
2. Nährmedien	13
2.1. MRS-Medium	13
2.2. Abgewandeltes MRS-Medium	13
2.3. Grundmedium zur Bestimmung der Spektren an vergärbaren Zuckern	13
2.4. Gemüse- und Fruchtsäfte als Nährlösung	14
3. Inkubationspuffer	14
4. Stammhaltung	14
5. Messung des Wachstums	14
6. Zellernte	14
7. Die Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten"	14
8. Enzymatische Bestimmung von Gärprodukten	15
8.1. Optischer Milchsäuretest	15
8.2. Optischer Acetat-Test	16
8.3. Enzymatische Bestimmung von Äthanol	16
8.4. Enzymatische Pyruvatbestimmung	16
8.5. Enzymatische Glucosebestimmung	17
8.6. Die Bestimmung von L-Malat mit Malatdehydrogenase	17
9. Durchführung von Gärversuchen	17
9.1. Eichung der Warburggefäße	17
9.2. Manometrische CO ₂ -Bestimmung im Warburgapparat	18
9.3. Gäransätze in Warburggefäßen	18

Inhaltsverzeichnis

10.	Auftrennung von Gärungsprodukten	18
10.1.	Die Decarboxylierung der Milchsäure	19
10.2.	Papierchromatographische Trennung von Malat und Lactat	19
10.3.	Die Trennung von Acetat und Formiat, sowie von Lactat und Formiat durch Säulen- chromatographie	20
10.3.1.	Herstellung der Kieselgelsäule	20
10.3.2.	Beschicken und Eluieren der Säule	20
C.	Ergebnisse	21
I.	Malatabbau durch Leuconostoc und Lactobacillen	21
I.a.	Nachweis des Malatabbaues durch Leuconostoc in verschiedenen Fruchtsäften anhand der L-Lactatbildung	21
I.b.	Einfluß von Malat auf die Glucosevergärung bei Leuconostoc und Streptobakterien	22
I.b.1.	Der Einfluß von Malat auf die "molar growth yield" der Glucosevergärung bei Leuco- nostoc mesenteroides	24
I.b.2.	Der Einfluß von Malat auf den "molaren ökonomischen Koeffizienten" der Glucose- vergärung bei anderen Lactobacillen	28
I.b.3.	Der Einfluß von Malat auf die Geschwindig- keit der Milchsäurebildung bei Leuco- nostoc mesenteroides	34
I.b.4.	Der Einfluß von Malat auf die Isotopenver- teilung bei Vergärung von Glucose-U- ¹⁴ C und Malat-U- ¹⁴ C	37
I.c.	Der Malatabbau durch Lactobacillus plantarum	42
I.c.1.	Abhängigkeit der Gärbilanz für L-Malat von verschiedenen Versuchsbedingungen	42

Inhaltsverzeichnis

I.c.2.	Markierungsverteilung in Malat aus Blatt-extrakten von CAM-Pflanzen nach Dunkel-fixierung von $^{14}\text{CO}_2$	49
II.	Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gär-produkte und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" bei Stämmen von Leuco-nostoc	53
II.1.	Der Vergleich der bei aeroben und anaeroben Wachstum gebildeten Gärprodukte	54
II.2.	Die Energiebilanz bei Leuconostoc nach aeroben und anaeroben Wachstum	54
II.3.	Wachstum, pH-Änderung und Gärprodukte von Leuconostoc paramesenteroides 883 bei aerober und anaerober Kultur	58
II.4.	Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gär-bilanz für Glucose bei Leuconostoc para-mesenteroides 883	60
II.5.	Die Verbreitung des Pyruvatabbaues bei ver-schiedenen Stämmen von Leuconostoc	63
II.6.	Die aerobe und die anaerobe Vergärung von Pyruvat und Formiat durch Leuconostoc paramesenteroides 883	65
II.7.	Zellausbeute und ATP-Produktion bei Leuconostoc mesenteroides 12291 bei Hemmung der Triosephosphat-Dehydrogenase	67
D.	Diskussion	70
I.	Der Malatabbau durch Leuconostoc und Lactobacillen	70
I.1.	Der Einfluß des Malats auf die Glucosever-gärung bei Leuconostoc	70

Inhaltsverzeichnis

I.2.	Die Stöchiometrie des Malatabbaues bei Lactobacillus plantarum	72
II.	Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gär- produkte und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" bei Stämmen von Leuco- nostoc	76
E.	Zusammenfassung	78
F.	Literaturverzeichnis	81

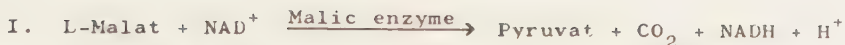
Verwendete Abkürzungen:

Acetald.	= Acetaldehyd
Acetyl-P	= Acetylphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
CAM	= Crassulacean Acid Metabolism
D-LDH	= D(-)-Lactat: NAD-Oxidoreductase EC 1.1.1.28
EtOH	= Äthanol
FAD	= Flavin-adenin-dinucleotid
Fru-6-P	= Fructose-6-Phosphat
GAP	= Glycerinaldehyd-Phosphat
Glu-6-P	= Glucose-6-Phosphat
6-P-Gluconat	= 6-Phospho-Gluconat
L-LDH	= L(+)-Lactat: NAD-Oxidoreductase EC 1.1.1.27
m	= molar
Mal.	= Malat
MRS	= DeMan, Rogosa and Sharpe (J.Appl.Bact.1960)
NAD ⁺	= β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert
NADH + H ⁺	= β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
Pentose-P	= Pentosephosphat
PEP	= Phosphoenolpyruvat
2-PGS	= 2-Phospho-Glycerinsäure
3-PGS	= 3-Phospho-Glycerinsäure
1,3-di-PGS	= 1,3-di-Phospho-Glycerinsäure
Pyr	= Pyruvat
ssp.	= subspecies
TPP	= Thiaminpyrophosphat
Trgw.	= Trockengewicht

A. Einleitung

I. Der Malatabbau durch Lactobacillen

Der Malatabbau durch Lactobacillen wurde zum ersten Mal von Korkes und Ochoa (1948) untersucht. Nachdem Ochoa et al. (1947) ein "Malic enzyme" aus Taubenleberextrakten isoliert hatten, das Malat zu Pyruvat und CO_2 decarboxylierte, beobachteten Korkes und Ochoa (1948), daß beim Wachstum von *Lactobacillus arabinosus* (*plantarum*) in einer Nährlösung mit Malatzusatz eine beachtliche, durch CO_2 hervorgerufene Gasentwicklung auftrat, während in der Nährlösung ohne Malatzusatz keine gasförmigen Gärprodukte entstanden. Aus den mit Malatzusatz gezogenen Zellen konnten sie ein "Malic enzyme" isolieren, das Malat wahrscheinlich in zwei Schritten zu Lactat und CO_2 nach folgendem Mechanismus umsetzt :



Für den Umsatz von Malat zu Lactat und CO_2 durch das isolierte Enzym waren Mn^{++} -Ionen und NAD^+ erforderlich; zwischenzeitlich gebildetes $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Pyruvat konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieses Enzym war zur quantitativen Bestimmung kleiner Mengen von L-Malat durch manometrische Bestimmung des beim Abbau gebildeten CO_2 geeignet. Malat ist auch noch bei gleichzeitigem Vorhandensein von Oxalacetat an Hand der gebildeten L-Milchsäure nachweisbar, da Oxalacetat nach Umsatzgleichung III nur bis zum Pyruvat abgebaut wird.



Nossal (1951) hat daraufhin bei malatadaptierten Zellen von *Lactobacillus arabinosus* den Einfluß verschiedener Ionen (K^+ , Mn^{++}) und den Einfluß weiterer gleichzeitig vorhandener Substrate (Glucose, Fructose, Mannose, Galaktose) auf die Malatdecarboxylierung untersucht. Er fand, daß sämtliche Faktoren begünstigend wirkten. Von weiteren Arbeiten, die sich mit der Charakterisierung und Reinigung des "Malic enzymes" aus *Lactobacillus arabinosus* und mit dem Mechanismus des Abbaues befaßten, ist die von Kaufmann et al. (1951) besonders erwähnenswert. Durch Ammoniumsulfatfällung gelang es, aus dem Rohextrakt ein gereinigtes Enzympräparat herzustellen, welches L-Malat ausschließlich zu L-Lactat und CO_2 umsetzte. Korkes und Ochoa (1948) hatten bei ihren Experimenten D/L-Lactat erhalten und daraus auf die Beteiligung der Lactatdehydrogenasen am Malatabbau geschlossen. Bei der Vergärung von Malat-1,4- ^{14}C konnte kein Pyruvat als Zwischenprodukt abgefangen werden. In Übereinstimmung mit den Befunden von Korkes und Ochoa (1948) war auch

die Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ nicht nachweisbar. Die Markierung war nach der Vergärung jeweils zur Hälfte auf L-Milchsäure und CO_2 verteilt. Die Autoren vermuteten, daß die Umsetzung von Malat mit Hilfe eines Enzymkomplexes vonstatten geht.

In der Folgezeit waren Malatenzyme aus Microorganismen immer wieder untersucht worden.

Mayer und Temperli (1963) fanden bei *Schizosaccharomyces pombe*, Fuck und Radler (1972) bei *Saccharomyces* ein NAD-abhängiges Malatenzym, das Malat zu Pyruvat und CO_2 decarboxylierte.

Kadsuki et al. (1967) konnten aus *Escherichia coli* sogar zwei Malatenzyme isolieren, die NAD- oder NADP-abhängig waren. Das NADP-abhängige Enzym wurde von Oxalacetat vollständig gehemmt, nicht aber das NAD-abhängige. Beide liefern aber die gleichen Endprodukte Pyruvat und CO_2 .

Deal und Lichstein (1961) konnten bei einer ganzen Reihe von *Lactobacillen* ein Malatenzym induzieren. Die untersuchten Stämme *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* und *Leuconostoc* waren alle in der Lage, nach Anzucht in einem malathaltigen Medium in Puffer mit gleichen Mengen an Glucose und Malat CO_2 zu entwickeln. Für *Leuconostoc* war auf Grund einer erhöhten Gärrate auf die Malatverwertung geschlossen worden.

Der eindeutige Nachweis des Abbaues von L-Äpfelsäure zu L-Lactat und CO_2 durch Stämme der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus* gelang jedoch erst Peynaud et al. (1966, 1967, 1968a, 1968b) und Radler et al. (1970).

Die nähere Untersuchung dieses Malatenzymes aus *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides* wurde von Schütz (1972) und Schütz und Radler (1973) vorgenommen. Sie stellten fest, daß NAD^+ für die Reaktion $\text{L-Malat} \rightarrow \text{L-Lactat} + \text{CO}_2$ in vitro zwar notwendig war, $\text{NADH} + \text{H}^+$ aber nicht nachweisbar ist. Pyruvat wird von diesem "Malic enzyme" auch in Gegenwart von $\text{NADH} + \text{H}^+$ nicht zu L-Lactat umgesetzt, während es bei *Leuconostoc mesenteroides* in vivo unter Mitwirkung der D-LDH ausschließlich zu D-Lactat reduziert wird.

Dieses Malatenzym, das die Reaktion von L-Malat zu L-Lactat und CO_2 ohne nachweisbares Pyruvat als Zwischenstufe katalysiert, wird von Schütz und Radler (1974) auch Malo-Lactat-Enzym genannt.

Im Gegensatz dazu nimmt Doelle (1971) auf Grund seiner Versuche mit *Leuconostoc mesenteroides* eine Aktivierung der L-LDH an, so daß in Anwesenheit von Malat und Glucose nicht nur mehr Milchsäure auf Grund des Malatabbaues, sondern auch mehr aus Glucose, und zwar das ungewöhnliche L-Isomer gebildet wird. Diese Angaben sind zumindest teilweise nicht mit dem bekannten Mechanismus der heterofermentativen Milchsäuregärung vereinbar.

Um diese Zweifel über die stöchiometrische Bildung von 1 Mol Milchsäure aus Glucose bei Anwesenheit von Malat zu entkräften, schien es angebracht, die Beeinflussung der Glucosevergärung durch Malat, sowie die Stöchiometrie des Malatabbaues durch *Leuconostoc mesenteroides* mit positionsmarkierten Substraten erneut zu prüfen und eine Isotopenbilanz aufzustellen (Kandler et al., 1973).

Zweifel über den stöchiometrischen Abbau des Malats durch Lactobacillen waren in neuerer Zeit durch Sutton und Osmond (1972) entstanden. Sutton und Osmond (1972)

verwendeten *Lactobacillus arabinosus* zum Abbau von Malat-1,4- ^{14}C und Malat-4- ^{14}C aus Blattextrakten von Pflanzen, die einen diurnalen Säurestoffwechsel (Crassulacean Acid Metabolism = CAM) aufwiesen, um die Aktivitätsverteilung im Malat zu studieren.

Sie zogen aus einigen ihrer Versuche den Schluß, daß beim Malatabbau CO_2 nicht nur aus C_4 , sondern auch aus anderen Positionen des Malats entsteht.

Da aber *Lactobacillus arabinosus* seit langer Zeit für die quantitative Bestimmung der Verteilung der Markierung in Malat aus Blattextrakten ^{14}C -gefütterter CAM-Pflanzen verwendet worden war, schien es erforderlich, die Stöchiometrie des Malatabbaues durch *Lactobacillus arabinosus* unter den verschiedensten Bedingungen zu überprüfen und die Einwände von Sutton und Osmond (1972) zu bestätigen oder zu widerlegen. Dies sollte durch Analyse der Gärprodukte und die Aufstellung einer Isotopenbilanz geschehen.

Die von Sutton und Osmond (1972) für *Lactobacillus arabinosus* vermutete Fortführung der Malatvergärung vom Lactat zu Acetat und CO_2 wurde neuerdings von London und Meyer (1969a), London et al. (1970, 1971a, 1971b) und Schütz und Radler (1974) bei sämtlichen Stämmen von *Streptococcus faecalis* und einigen Stämmen von *Lactobacillus casei* gefunden. Die Autoren stellten ein Wachstum dieser Stämme auf Malat fest. Dabei wird ein Malatenzym induziert, das nicht wie das bei vielen heterofermentativen und homofermentativen Milchsäurebakterien nach Wachstum in Nährlösung mit Glucose + Malat vorhandene Malo-Lactat-Enzym L-Äpfelsäure zu Lactat und CO_2 umsetzt, sondern zu Pyruvat und CO_2 . Dieses Pyruvat wird nicht unmittelbar am Enzymkomplex reduziert, sondern ist als freies Pyruvat faßbar und unterliegt in den Zellen der phosphoroklastischen

Spaltung zu CO_2 und Acetat. Auf dem dabei möglichen Energiegewinn beruht wohl das Wachstum dieser Organismen auf Malat.

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit auch andere Lactobacillen, insbesondere aus der Gruppe der heterofermentativen Betabakterien und Leuconostoc in der Lage sind, aus der Malatvergärung Energie zu gewinnen. Dies sollte durch Bestimmen des "molaren ökonomischen Koeffizienten" geprüft werden.

II. Der "molare ökonomische Koeffizient" bei Lactobacillen

Schon vor 100 Jahren hat Pasteur (1876) die Ökonomie der Substratnutzung bei Hefekulturen untersucht. Er kam zu dem Schluß, daß das Verhältnis des Zuwachsgewichtes abhängig ist von der Menge der verbrauchten Nährstoffe. Durch den Quotienten Zuwachsgewicht pro Menge verbrauchter Nährstoffe hat er als erster versucht, eine zahlenmäßige Angabe des Wachstums zu machen.

Dieser Gedanke wurde in der Folgezeit von Pfeffer (1895) aufgegriffen. Er ermittelte den Quotienten "gebildete Körpermasse in Gramm pro 100 Gramm verbrauchtes Substrat" für Pilze auf verschiedenen Kulturmedien und nannte ihn "ökonomischer Koeffizient". Von anderen Autoren wurde dieser Koeffizient später auch "Pfefferkoeffizient" genannt.

Dabei wird das Verhältnis des Substratverbrauches zur Trockengewichtszunahme umso größere Werte annehmen, der ökonomische Koeffizient also umso kleiner werden, je schlechter die "stoffliche Ökonomie der Energiebereitstellung" ist. Aerob atmende Organismen werden pro Einheit des Zuwachstrockengewichtes weniger Substrat verbrauchen als anaerob gärende Organismen. Neben dem Abbau der Nähr-

stoffe spielt auch die Einbeziehung anderer Energiequellen, z.B. der Photosynthese oder der Chemosynthese für die Substanzproduktion eine große Rolle für den ökonomischen Koeffizienten. Daher läßt sich leicht ersehen, daß nur bei der Bestimmung des ökonomischen Koeffizienten heterotropher Organismen vergleichbare Werte zu erhalten sind.

In späterer Zeit wurden noch mehrere solcher Koeffizienten unter den verschiedensten Gesichtspunkten definiert, unter anderem von Kandler (1950) der sog. synthetische Wirkungsgrad = assimiliertes Substrat in Mol/veratmetes Substrat in Mol.

Für Bakterien hat wohl Monod (1942) zum ersten Mal derartige Beziehungen überprüft. Er untersuchte das Wachstum von *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* unter aeroben Bedingungen in einem Minimalmedium mit einer großen Zahl von Kohlehydraten als Kohlenstoff- und Energiequelle. Aus den Ergebnissen seiner Experimente folgerte er, daß das microbielle Wachstum bei begrenzender Energiequelle proportional den hinzugefügten Kohlehydraten ist. Monod (1942) spricht von einem "yield factor", den er als $k = \text{Zuwachs in g/Substratverbrauch in g}$ definiert. Er ist inhaltlich identisch mit dem "Pfefferkoeffizienten".

Bauchop und Elsdon (1960) haben die heute allgemein übliche Form der Darstellung von ökonomischen Koeffizienten für das Wachstum von Microorganismen eingeführt. Sie drückten das Trockengewicht in g, die verbrauchte Substratmenge aber in Mol aus. Der auf diese Weise definierte "molare ökonomische Koeffizient" (= "molar growth yield") wird üblicherweise wie folgt ausgedrückt :

$$Y_{\text{Substrat}} = \frac{\text{Zunahme des Trockengewichtes in g}}{\text{verbrauchtes Substrat in Mol}}$$

Die Verwendung dieses Koeffizienten ermöglicht es, das Wachstum auf verschiedenen Substraten unterschiedlichen Molekulargewichtes direkt zu vergleichen.

Die Bedeutung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" zur Aufklärung der Energieausbeute bei einem Abbauweg konnten De Moss et al. (1951) bei Milchsäurebakterien sehr schön demonstrieren. Die Autoren haben bei drei Stämmen von Milchsäurebakterien Y_{Glucose} bestimmt. Sie fanden für *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus delbrückii* ungefähr den doppelten Wert (20 mg/mmol) wie für *Leuconostoc* (14 mg/mmol) und folgerten daraus, daß *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus delbrückii* Glucose energetisch besser ausnützen können als *Leuconostoc mesenteroides*.

Die Richtigkeit dieser Folgerung haben Gunsalus und Gibbs (1952) und Hurwitz (1958) bestätigt, als sie für *Leuconostoc* den Hexosemonophosphatweg für die Glucosevergärung nachwiesen, wobei nur ein Mol ATP pro Mol verbrauchter Glucose gewonnen wird.

Bei den homofermentierenden Milchsäurebakterien *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus delbrückii*, die Glucose glykolytisch nach dem Embden-Meyerhof-Parnas-Weg abbauen, werden dagegen 2 Mol ATP pro Mol verbrauchter Glucose gebildet. Dies erklärt den Unterschied um den Faktor 2 bei der Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" für den Abbau ein und desselben Substrates durch zwei verschiedene Organismen.

Andererseits geht aus den Versuchen von Sokatch und Gunsalus (1957) hervor, daß der Abbau zweier verschiedener Substrate durch *Streptococcus faecalis*, nämlich Glucose und Gluconat, dieselben Werte für den "molaren ökonomischen Koeffizienten" liefert. Der Abbau beider Substrate ist also mit demselben Energiegewinn verbunden.

Anders verhält es sich bei dem von De Moss et al. (1951) untersuchten Abbau von Glucose und Arabinose durch *Leuconostoc mesenteroides*. Überraschenderweise hatte sich dabei ergeben, daß Arabinose zu einem höheren Energiegewinn ($Y_{\text{Arabinose}} = 16.2$) als Glucose ($Y_{\text{Glucose}} = 14.2$) führte. Nachdem inzwischen durch die Aufklärung des Gärmechanismus bei heterofermentierenden *Lactobacillen* klar geworden war, daß bei der Vergärung von Arabinose entsprechend der Gleichung $\text{Arabinose} \rightarrow \text{Lactat} + \text{Acetat} \quad 2 \text{ Mol ATP gebildet werden}$, während beim Abbau der Glucose wegen der Notwendigkeit der Reduktion von Acetylphosphat zu Äthanol nur 1 Mol ATP entsteht, sahen Bauchop und Elsden (1960) in dem Befund von De Moss et al. (1951) einen Beweis dafür, daß das Wachstum von Mikroorganismen direkt proportional der aus der Energiequelle produzierten ATP-Menge ist. ($Y_{\text{ATP}} = \text{Bakterientrockengewicht in g/Netto-ATP-Gewinn in Mol}$). Aus den verschiedenen Untersuchungen ergab sich $Y_{\text{ATP}} = 10.5$.

Der für *Leuconostoc mesenteroides* von De Moss et al. (1951) gefundene Wert $Y_{\text{Glucose}} = 14.2 \text{ (g/mol)}$ liegt für den Abbau der Glucose nach dem Hexosemonophosphatweg zu hoch. Er ist erklärbar, wenn die Bestimmung nicht unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, so daß der Wasserstoff über Flavinenzyme auf Sauerstoff übertragen wurde. Damit könnte ein Teil des Acetylphosphates zu Acetat dephosphoryliert werden. Bei *Lactobacillen* ist es daher notwendig, im Überstand des Gärmediums eine Acetatbestimmung durchzuführen, um den Y_{ATP} -Wert entsprechend korrigieren zu können.

Nicht nur für heterofermentierende *Lactobacillen* sind Abweichungen von den theoretisch auf Grund des bekannten Abbaufweges erwarteten Y_{Substrat} -Werten beschrieben worden, sondern auch für homofermentierende Milchsäurebakterien ergaben sich breite Streuungen. So fanden Oxenburgh und Snoswell (1965) für *Lactobacillus plantarum* unter aeroben Wachstumsbedingungen einen Y_{Glucose} -Wert von 18,8, während

Brown (1968) für denselben Organismus nach Wachstum unter anaeroben Bedingungen einen Y_{Glucose} -Wert von 22.8 fand.

Diese unterschiedlichen Werte veranlaßten Dirar und Collins (1972) "molar growth yield"-Bestimmungen bei verschiedenen homofermentativen Lactobacillen durchzuführen, wobei sie den Vorschlag von Gunsalus und Shuster (1961) befolgten, nach Ende des Wachstums die Gärprodukte, auch das eventuell für zusätzlichen Energiegewinn verantwortliche Acetat zu bestimmen. Verluste durch Autolyse bei zu langer Inkubation (Moustafa und Collins, 1968a) wurden vermieden.

Dirar und Collins (1972) fanden für die untersuchten Lactobacillen (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* und *Lactobacillus casei*) unter Berücksichtigung des bei der Fermentation gebildeten Acetats den erwarteten Wert von $Y_{\text{ATP}} = 10.5$ (g/mol).

Während also hier durch phosphoroklastische Spaltung von Pyruvat zu Acetat und CO_2 zusätzlich ATP und damit ein etwas erhöhter Y_{Glucose} -Wert entstand, ist in anderen Fällen die oxidative Phosphorylierung dafür verantwortlich. Während dies für aerob wachsende Organismen (*Azotobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* und *Aerobacter aerogenes*) schon längere Zeit bekannt ist (vergl. Van der Beck et al. (1973)), sind Berichte, wonach auch Milchsäurebakterien (*Streptococcus faecalis*, Smalley et al., 1968 und *Streptococcus agalactiae*, Mickelson, 1972) eine unter Sauerstoffverbrauch ablaufende oxidative Phosphorylierung aufweisen sollen erst neuerdings erschienen und bedürfen wohl noch der Überprüfung.

Für heterofermentierende Milchsäurebakterien existieren außer den sehr frühen Angaben von De Moss et al. (1951) keine weiteren Angaben. Die Versuche waren, soweit man

den Beschreibungen entnehmen kann, unter mikroaerophilen Bedingungen durchgeführt worden.

Wie Johnson und Mc.Cleskey (1957, 1958) zeigten, sind viele Stämme von *Leuconostoc mesenteroides* in der Lage, unter aeroben Bedingungen anstelle von Äthanol Acetat zu bilden, da sie offensichtlich den Gärungswasserstoff auf Luftsauerstoff übertragen können. Dies legt die Vermutung nahe, daß unter diesen Bedingungen zusätzlich ATP durch Spaltung von Acetylphosphat gewonnen wird, was aber bisher nie experimentell geprüft wurde. Weiterhin ist es denkbar, daß wie bei den anderen Milchsäurebakterien auch bei *Leuconostoc* ein Teil des Pyruvates phosphoroklastisch unter Energiegewinn zu Formiat und Acetat gespalten wird, so daß es nicht unbedingt zu Lactat reduziert werden muß. Auch diese Möglichkeit wurde bisher nicht eingehend untersucht.

Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluß von Sauerstoff sowohl auf die Gärungsprodukte als auch auf Σ Glucose zu untersuchen.

B. Material und Methoden

1. Organismen:

Folgende Stämme wurden untersucht:

Unter- gattung	Species	Subspecies	Her- kunft	Bezeich- nung
Thermo- bacterium	L.acidophilus		Gasser	AM 63
	L.lactis		DSM	20072
	L.bulgaricus		Whst	3
Strepto- bacterium	L.casei	casei	ATCC	393
	L.casei	pseudoplant.	DSM	20008
	L.casei	rhamnosus	ATCC	7469
	L.coryniformis	torquens	DSM	20005
	L.curvatus		Elnaga	8
	L.plantarum	plantarum	ATCC	14917
	L.plantarum	arabinosus	ATCC	8014
	L.sake		ATCC	15521
	L.xylosus		ATCC	15577

Unter- gattung	Species	Subspecies	Her- kunft	Bezeich- nung
Beta-	L.brevis			124
bacterium	L.fermenti		ATCC	14931
	L.fermenti		DSM	20049
	L.reuteri, Typ II		DSM	20016
Leuconostoc	mesenteroides	mesenteroides	ATCC	12291
	mesenteroides	mesenteroides	ATCC	14430
	mesenteroides	mesenteroides	ATCC	10878
	mesenteroides	mesenteroides	ATCC	10830
	mesenteroides	mesenteroides	ATCC	9135
	mesenteroides	mesenteroides	NCDO	538
	mesenteroides	mesenteroides	NCDO	523
	mesenteroides	mesenteroides	NCDO	183
	mesenteroides	amelibiosum	ATCC	13146
	dextranicum		NCDO	517
	lactis		Nizo	ZgV ₁
	paramesenter.	paramesenter.	NCDO	883
	spec.		Dr.Stetter	G

Abkürzungen:

- ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- DSM = Deutsche Sammlung für Microorganismen, Göttingen
- Elnaga = Dr.Ibrahim G.Abo-Elnaga und Prof.Kandler (1965)
- Gasser = Dr.F.Gasser, Institut Pasteur, Paris
- NCDO = National Collection of Dairy Organisms, Shinfield, Reading, England
- Nizo = Ned.Institut voor Zuivelonderzoek, Ede, Holland
- Whst. = Bakteriologisches Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan.

2. Nährmedien

2.1. MRS-Medium (De Man et al., 1960)

Für die Anzucht der Bakterien wurde ein komplexes, von De Man et al. (1960) beschriebenes Nährmedium verwendet. Es enthielt pro Liter 1 % Pepton (aus Casein, tryptisch verdaut), 0,2 % Fleischextrakt (Merck), 0,4 % Hefeextrakt (Merck), 0,1 % Tween 80, 0,2 % K_2HPO_4 , 0,5 % Natriumacetat, 0,2 % Diammoniumcitrat, 0,02 % Magnesiumsulfat $\cdot 7 H_2O$, 0,005 % Mangansulfat $\cdot H_2O$ und als Kohlehydratquelle 2 % Glucose. Der pH-Wert wurde mit 3 n Natronlauge auf 6.4 eingestellt.

Zur Herstellung fester Nährböden wurden diesem Ansatz noch 15 g Agar pro Liter zugesetzt.

2.2. Abgewandeltes MRS-Medium

Um auch Acetat als Gärprodukt quantitativ nachweisen zu können, mußte folgende Abwandlung der ursprünglichen Nährlösung vorgenommen werden :

Acetat und Diammoniumcitrat wurden weggelassen und die Pufferkapazität durch Zugabe von 0,2 % K_2HPO_4 und 1.1 % KH_2PO_4 wiederhergestellt. Die Phosphatmengen wurden durch vergleichende Titration von normaler und abgewandelter MRS-Nährlösung mit Milchsäure ermittelt.

2.3. Grundmedium zur Bestimmung der Spektren an vergärbaren Zuckern (Sharpe, 1962)

MRS-Medium ohne Glucose und ohne Fleischextrakt wurde mit 0,004 % Chlorphenolrot als Indikator versetzt und nach Einstellen des pH-Wertes auf 6.4 20 Minuten autoklaviert. Anschließend wurden die verschiedenen Zucker als sterile, 10 %ige Lösungen bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und noch einmal 10 Minuten im Dampftopf erhitzt. Der Indikatorumschlag zeigte ein Wachstum an.

2.4. Gemüse- und Fruchtsäfte als Nährlösung

Zur Bestimmung des Wachstums und der Vergärbarkeit von Malat in Gemüse- und Fruchtsäften wurden diese fraktioniert sterilisiert. Im Falle des Apfelsaftes wurde vorher mit NaOH auf pH = 6.4 titriert.

3. Inkubationspuffer

Für Puffervergärungen von Malat, Pyruvat und Glucose wurde ein 0,1 molarer Phosphatpuffer mit pH = 6.4 verwendet, wobei der gewünschte pH-Wert durch Mischen 0,1 molarer Lösungen von K_2HPO_4 und KH_2PO_4 eingestellt wurde. Die Überprüfung erfolgte mit der Glaselektrode.

4. Stammhaltung

Zur Aufbewahrung der verwendeten Stämme wurden MRS-Agarstiche angelegt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

5. Messung des Wachstums

Das Wachstum wurde durch Bestimmen der optischen Dichte der Kultur im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen. Als Leerwert diente jeweils der Überstand der einzelnen Proben nach Abzentrifugieren der Bakterien.

6. Zellernte

Die Zellernte für Bestimmungen des "molaren ökonomischen Koeffizienten" und für Puffervergärungen geschah bei 13 000 g.

7. Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten"

(= "molar growth yield"-Bestimmung) (Stouthamer, 1969)

Dazu wurden 150 ml normales MRS-Medium mit einer für das Wachstum begrenzenden Glucosemenge (0,2 - 0,4 %) in 200 ml-Kolbchen für anaerobe und in Literkolben für aerobe Ansätze

verwendet. Als Leerwert diente die entsprechende Nahrungslösung ohne Glucosezusatz.

Für Wachstumsbestimmungen mit Malat wurde zusätzlich Malat zugegeben.

Nach Ende des Wachstums wurde die bewachsene Kulturlösung jeweils quantitativ in Zentrifugenbecher übergeführt und 10 Minuten bei 13 000 g unter Kühlung abzentrifugiert. Anschließend wurden die einzelnen Proben zweimal gewaschen und in Wägegläschen bei 120°C 24 Stunden getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Zelltrockengewicht auf einer Analysenwaage ausgewogen.

8. Enzymatische Bestimmungen von Gärungsprodukten

Die dazu nötigen Enzyme stammen von Boehringer, Mannheim; D-LDH wurde aus *Leuconostoc mesenteroides* 12291 angereichert.

8.1. Optischer Milchsäuretest

Die Bestimmung der beiden Milchsäureisomeren D- und L-Lactat erfolgte enzymatisch mit Hilfe des optischen Testes (Horost, 1962; Stetter, 1973). Die beiden Isomeren D- und L-Lactat wurden in getrennten Ansätzen mit stereospezifischer D- oder L-Lactatdehydrogenase nachgewiesen.

Reaktionsprinzip



Um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite des Pyruvats zu verschieben, wird dieses als Hydrazon (Glycin-Hydrazin-Puffer, pH = 9) weggefangen. Die gebildete Menge an NADH + H⁺ ist proportional dem D- oder L-Lactat und kann photometrisch bei 366 nm bestimmt werden.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{Lactat (mg/ml)} = \frac{\Delta E_{\text{kor.}} \cdot V_{\text{Küv.}} \text{ (ml)} \cdot \text{Verd.} \cdot 90}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Einsatz}} \text{ (ml)} \cdot 1000}$$

$\Delta E_{\text{korrr.}}$	= Extinktionsdifferenz Probe - Extinktionsdifferenz Nullküvette
$V_{\text{Küv.}}$	= Gesamtvolumen der Küvette
Verd.	= Verdünnungsfaktor
ϵ	= molarer Extinktionskoeffizient von reduziertem NAD^+
90	= Molekulargewicht der Milchsäure

8.2. Optischer Acetattest

Die Bestimmung von Acetat in vergorenen Nährlösungen erfolgte mit Acetatskinase und Hydroxylamin (Holz, Bergmeyer, 1970). Dabei wird Acetat mit ATP und Acetatskinase zu Acetylphosphat und ADP und Acetylphosphat mit Hydroxylamin zu Acetylhydroxamsäure umgesetzt. Letztere bildet in saurerer Lösung mit Fe(III) -Salzen einen roten bis rotvioletten Farbkomplex, dessen Intensität ein Maß für die vorhandene Acetatmenge darstellt. Als Bezugspunkt wird eine Bestimmung mit einem Acetatstandard verwendet.

8.3. Enzymatische Bestimmung von Äthanol (Bernt und Gutmann, 1970).

Das Reaktionsprinzip ist die Umsetzung von Äthanol zu Acetaldehyd mit Hilfe von NAD^+ und Alkoholdehydrogenase. Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet, welches der Äthanolmenge direkt proportional ist und im Photometer bestimmt werden kann. Der Bestimmungsansatz wurde aus H.U.Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse (1970) direkt übernommen.

8.4. Enzymatische Pyruvatbestimmung mit Lactatdehydrogenase.

Pyruvat wird mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ und L-LDH zu Lactat und NAD^+ umgesetzt. Die Reaktion kann an der Abnahme der Extinktion, die der Pyruvatmenge proportional ist, verfolgt werden.

Bestimmungsansatz:

0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7.5	:	3 ml
Probe oder Standard (25 $\mu\text{mol/ml}$)	:	0,2 ml
$\text{NADH} + \text{H}^+$ (10 mg/ml)	:	0,2 ml
L-LDH	:	0,01 ml
$V_{\text{Küvette}}$	:	3,41 ml

8.5. Die enzymatische Glucosebestimmung.

Sie erfolgte entweder nach der GOD-Methode (Biochemica-Test-Kombination, Boehringer, Mannheim) oder mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, abgeändert nach Bergmeyer (1970).

8.6. Die Bestimmung von Malat erfolgte nach Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse (1970).

L-Malat wird mit NAD und Malatdehydrogenase zu Oxalacetat und $\text{NAD} + \text{H}^+$ umgesetzt, das Oxalacetat als Oxalacetat-hydrazon aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt und die $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Menge im Photometer bestimmt. Sie ist direkt proportional der L-Malatkonzentration.

9. Durchführung von Gärversuchen.

Die Vergärung markierter und nichtmarkierter Substrate wurde im Warburgapparat in doppelarmigen Gefäßen mit Mitteleinsatz vorgenommen. Die Schüttelfrequenz war in allen Fällen ca. 110 Ausschläge/Min., die Versuchstemperatur betrug jeweils 30°C.

9.1. Eichung der Warburggefäße

Die Eichung der Warburggefäße erfolgte gravimetrisch mit Hilfe von Quecksilber. Dazu wurde ein Gefäß an ein geeichtes Manometer ohne Brodie-Lösung gekoppelt, zweimal bis zu verschiedenen Marken auf der Manometerskala angefüllt und jeweils das Gewicht der Quecksilberfüllung bestimmt. Aus der Gewichts- und der Skalendifferenz errechnet sich das Gewicht des Quecksilbers pro Skalenteil und damit ist das Gewicht des Gefäßes und der Manometerfüllung bis zur Marke 15 bekannt. Mit der Formel $G = V \cdot \rho$ (G = Gewicht, V = Volumen, ρ = Dichte_{Hg}) läßt sich das Gesamtvolumen Gefäß + Manometer und daraus nach Abzug des bekannten Manometervolumens das Gefäßvolumen berechnen.

9.2. Manometrische CO_2 -Bestimmung bei Gärversuchen im Warburgapparat.

Die produzierte CO_2 -Menge wird im Warburgapparat als Druckanstieg bei konstantem Volumen registriert. Der Druckanstieg ist direkt proportional der CO_2 -Menge, wenn CO_2 als einziges Gas entweicht. In einer Parallelprobe mit KOH im Mitteleinsatz darf sich der Druck nicht ändern.

Unter aeroben Bedingungen sind CO_2 -Entwicklung und O_2 -Verbrauch nach der 2-Gefäß-Methode bestimmt worden.

Um eine Retension der CO_2 -Menge auf Grund zu hohen pH-Wertes zu vermeiden, wurde am Ende der Vergärung aus dem 2. Seitenarm H_2SO_4 zugekippt und kurze Zeit weitergeschüttelt.

9.3. Gäransätze in Warburggefäßen

Anaerobe Vergärungen von Substraten wurden in Stickstoffatmosphäre, aerobe Vergärungen in Luft durchgeführt.

Im Hauptraum der Gefäße befanden sich 10 ml 0,1 m Phosphatpuffer meist mit einem pH-Wert von 6,4 (Abweichungen davon sind im Text angegeben) und die in der log-Phase ($\Delta E = 0,6-0,8$) geernteten Zellen mit einem Trockengewicht von in der Regel 50 mg.

Die Substrate wurden aus der ersten seitlichen Ansatzbirne nach Erreichen konstanter Bedingungen zugekippt, die Schwefelsäure zur Austreibung gelösten CO_2 am Ende der Vergärung aus der zweiten Ansatzbirne.

10. Auftrennung der Gärungsprodukte aus markierten Substraten

CO_2 wurde in 5 %iger KOH im Mitteleinsatz der Warburggefäße als $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$ aufgefangen. Alle weiteren markierten Gärprodukte wurden nach Neish (1952) aufgetrennt. Dazu wurde der Inhalt jedes Warburggefäßes quantitativ in Zentrifugenbecher übergeführt, die Bakterien abzentrifugiert, zweimal gewaschen und in 5 ml Wasser aufgenommen. Die vereinigten Überstände wurden mit 0,1 n NaOH neutralisiert und sodann einer Destillation zur Austreibung des bei der Gärung entstandenen Äthylalkohols

unterworfen. Das Destillat wurde in 50 ml Chromschwefelsäure (chromatgesättigt) aufgefangen und vollständig zu Essigsäure oxidiert. Diese wurde durch Wasserdampfdestillation (Apparatur nach Wiesenberger, 1948) gewonnen und davon nach Neutralisation der ^{14}C -Gehalt bestimmt.

Aus dem Rückstand der Alkoholdestillation wurde nach Ansäuerung mit 2 ml halbkonz. H_2SO_4 das Acetat und eventuell vorhandenes Formiat durch Wasserdampfdestillation gewonnen. Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wurde mit H_2SO_4 auf pH = 1 gebracht und die noch enthaltene Milchsäure, sowie die Formiatreste durch Äther extrahiert.

Die Radioaktivität jedes einzelnen Gärproduktes wurde durch Ausstreichen von 0,02 ml der Lösungen in unendlich dünner Schicht auf Kupfer- $(\text{K}_2^{14}\text{CO}_3)$ oder Aluminiumplättchen (Acetat, Lactat, Formiat) und Messung im Methandurchflußzähler (Friesseke und Höpfner, Erlangen-Bruck, Typ FH 49 B) ermittelt.

10.1. Die Decarboxylierung der Milchsäure zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung auf die einzelnen C-Atome.

Um zu sehen, ob die Markierung der Milchsäure in der Carboxylgruppe oder in den restlichen beiden C-Atomen lokalisiert ist, wurde die Milchsäure decarboxyliert. In Anlehnung an Neish (1952) wurde das Natriumlactat mit ca. 100 ml H_2O verdünnt und mit 10 ml 10 n H_2SO_4 versetzt. Nach dem CO_2 -freispielen der Apparatur wurden 10 ml gesättigte Kaliumdichromatlösung zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten lang bei 100°C gekocht und das entwickelte CO_2 mit einem Stickstoffstrom in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ übergetrieben. Nach Rücktitration wurde das restliche $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ auf Porzellanfiltern abgenutscht, getrocknet und in unendlich dicker Schicht die Radioaktivität gezählt.

10.2. Papierchromatographische Trennung von Malat- ^{14}C und Lactat- ^{14}C .

Die Trennung von nichtvergorenem L-Malat und bei der Vergärung gebildetem L-Lactat nach der Ätherextraktion (nichtvergorenes Malat geht mit der Milchsäure über) geschah papierchromatographisch auf Whatman 1 mit Phenol/Eisessig/ H_2O /EDTA (840:10:160:1).

Nach autoradiographischer Lokalisierung der Banden wurde die Aktivitätsverteilung auf dem Papier bestimmt.

10.3. Die Trennung von Acetat und Formiat und die Trennung von Lactat und Formiat mit Hilfe einer Kieselgelsäule.

10.3.1. Herstellen der Säule.

8 g getrocknetes Kieselgel und 4.65 ml 0,01 n HCl werden in einer Reibschale mit 50 ml wassergesättigtem Chloroform verrührt und in eine Säule (1 cm x 25 cm) mit Füllstutzen (1 cm x 25 cm) gegossen. Nach dem Absetzen wird der Überstand abgehebert, durch 5 ml wasserfreies Chloroform ersetzt und 1 g trockenes Kieselgel eingerührt. Nach dem Absetzen entfernt man wieder den Überstand und überschichtet mit 0,5 g Dowex (H^+ -Form). Damit ist die Säule fertig zum Beschicken.

10.3.2. Beschicken und Eluieren der Säule.

Etwa 0,5 mmol Acetat und 0,5 mmol Formiat werden auf die Dowexschicht aufgetragen und nach dem raschen Eindringen mit dem ersten Laufmittel (2,5 % n-Butanol in wassergesättigtem Chloroform) überschichtet. Das Eluat wird in 400-Tropfen-Fractionen in 1 ml mit Phenolphthalein versetztem Wasser aufgefangen. Durch Titration mit 0,1 n NaOH wird der erste Säurepeak (Acetat) ermittelt.

Zur Eluation von Formiat wird eine Mischung von 7,5 % n-Butanol in wassergesättigtem Chloroform verwendet.

Die vereinigten Fractionen eines Peakes werden mit einem Rotations-Vakuum-Verdampfer eingetrocknet und in einem definierten Volumen aufgenommen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie oben im Methandurchflußzähler.

Zur Trennung von Formiat und Milchsäure verwendet man als erstes Laufmittel 7,5 % n-Butanol in wassergesättigtem Chloroform (eluert Formiat) und anschließend 20 % n-Butanol in wassergesättigtem Chloroform (eluert Milchsäure).

C. Ergebnisse

I. Malatabbau durch Leuconostoc und Lactobacillen

I.a) Nachweis des Malatabbaues durch Leuconostoc in verschiedenen Fruchtsäften an Hand der L-Lactatbildung.

Die Umsetzung von L-Äpfelsäure durch Milchsäurebakterien ist von praktischer Bedeutung für den biologischen Säureabbau in Wein (Radler, 1966; Kunkee, 1967) und wahrscheinlich auch für den Säureabbau in Fruchtsäften.

Aufgrund des Malatgehaltes von pflanzlichen Säften (Frucht-, Gemüsesäfte) entsteht bei deren Vergärung durch Leuconostoc mesenteroides keine reine D-Milchsäure, wie aus der Zucker- vergärung zu erwarten wäre, sondern eine mehr oder weniger große Beimischung von L-Milchsäure. Außerdem wird durch die Lactatbildung aus Malat das für die Zuckervergärung typische Verhältnis von flüchtiger zu nichtflüchtiger Säure von 1 : 1 verschoben. Dieser Einfluß hat lange Zeit verhindert, daß die

stöchiometrischen Gesetzmässigkeiten für die Entstehung von Gärungsprodukten aus Glucose erkannt wurden. Erst durch De Moss (1951), der die Gärbilanz mit ruhenden Zellen in Pufferlösung durchführte, wurde diese Schwierigkeit überwunden.

Nachdem nunmehr feststeht, daß aus L-Malat L-Lactat entsteht, kann bei der Untersuchung von durch *Leuconostoc mesenteroides* vergorenen Fruchtsäften vom L-Lactatgehalt auf den L-Malatgehalt zurückgeschlossen werden. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob alle *Leuconostoc*-Stämme zum Malatabbau befähigt sind. Daher wurden in einem Vergleichsversuch drei verschiedene Pflanzensäfte mit einer größeren Zahl von *Leuconostoc*-Stämmen verschiedener Arten inkubiert.

Wie die Tabelle 1 zeigt, wurden in allen drei Fruchtsäften 1-3 mg L-Lactat/ml neben etwa der doppelten Menge D-Lactat gebildet, während in MRS-Medium, das kein Malat enthielt, erwartungsgemäß nur D-Lactat entstand.

Die L-Lactatbildung ist allerdings auf die Art *Leuconostoc mesenteroides*, von der sich alle neun untersuchten Stämme qualitativ einheitlich verhielten, beschränkt. Dagegen fehlt die Malatverwertung bei den Arten *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc lactis* und *Leuconostoc spec.*, Stamm G. Demnach stellt die Malatvergärung ein charakteristisches Merkmal für *Leuconostoc mesenteroides* dar, das auch zur Abtrennung von anderen *Leuconostoc*-Stämmen benützt werden kann.

I. b) Beeinflussung der Glucosevergärung durch Malat.

Doelle (1971) hat die Unabhängigkeit von Glucosevergärung und Malatabbau, wie sie von Peynaud et al. (1966), Radler et al. (1970) und Schütz (1969) gezeigt werden konnte, angezweifelt und berichtet, daß bei gleichzeitigem Abbau von

Tab.1: Milchsäureisomerenverhältnis beim Wachstum von Leuconostocstämmen in verschiedenen natürlichen Nährlösungen

Art	Stamm-Nr.	MRS - pH = 6.3						Karottensaft - pH = 5						Krautsaft - pH = 6.1						Apfelsaft - pH = 5.95					
		Ges.- Ms. mg/ml	D-Lactat		L-Lactat		pH	Ges.- Ms. mg/ml	D-Lactat		L-Lactat		pH	Ges.- Ms. mg/ml	D-Lactat		L-Lactat		pH	Ges.- Ms. mg/ml	D-Lactat		L-Lactat		pH
Lc.mes.	523	2.36	2.32	98.4	0.04	1.6	0	5.89	4.18	71.0	1.71	29.0	0	5.66	4.46	79	1.20	21	4.1	7.02	4.08	57.2	2.94	42.8	4.26
Lc.mes.	14430	6.58	6.54	99.3	0.04	0.7	0	6.29	4.68	74.5	1.61	25.5	0	6.58	3.86	59	2.72	41	4.1	5.55	4.52	81.5	1.03	18.2	4.31
Lc.mes.	10830	3.34	3.31	99.6	0.03	0.4	0	5.97	4.46	74.5	1.51	25.5	0	5.31	4.33	82	0.98	18	4.1	6.37	3.58	56.2	2.79	43.8	4.41
Lc.mes.	538	3.66	3.63	99.3	0.03	0.7	0	6.25	4.59	73.6	1.66	26.4	0	5.83	4.34	75	1.49	25	4.1	6.71	3.81	56.8	2.90	43.2	4.34
Lc.mes.	9135	2.42	2.39	99.2	0.03	0.8	0	7.23	5.18	71.7	2.05	28.3	0	5.22	4.20	80	1.02	20	4.1	7.57	4.69	62.0	2.88	38.0	4.19
Lc.mes.	10878	5.83	5.80	99.6	0.03	0.4	0	8.89	6.56	73.8	2.33	26.2	0	5.40	4.16	77	1.24	23	4.0	6.08	4.18	69.0	1.90	31.0	4.24
Lc.mes.	12291	6.63	6.63	100	0.00	0.0	3.5	4.31	3.15	73.2	1.16	26.8	0	9.77	8.47	87	1.30	13	0	9.26	4.38	47.4	4.88	52.6	5.32
Lc.mes.	183	5.04	5.02	99.6	0.02	0.4	0	4.83	3.77	78.2	1.06	21.8	0	3.84	2.09	54	1.75	46	0	2.21	1.20	54.4	1.01	45.6	6.15
Lc.mes.	13146	5.47	5.44	99.4	0.03	0.6	0	5.15	3.09	60.0	2.06	40.0	0	8.96	7.14	80	1.82	20	0	5.48	3.04	55.5	2.44	44.5	4.6
Lc.dextr.	517	2.56	2.56	100	0.00	0.0	0	1.84	1.83	99.3	0.01	0.7	0	2.83	2.83	100	0.00	0.0	4.5	1.17	1.17	100	0.00	0.0	5.06
Lc.parames.	883	3.77	3.77	100	0.00	0.0	0	3.46	3.44	99.6	0.02	0.4	0	5.48	5.48	100	0.00	0.0	4.2	2.93	2.93	100	0.00	0.0	4.64
Lc.lactis	ZgV ₁	3.47	3.39	98.0	0.08	2.0	0	2.66	2.64	99.4	0.02	0.6	0	3.86	3.82	99	0.04	1.0	4.2	3.11	3.11	100	0.00	0.0	4.52
Lc.spec.	G	4.87	4.82	98.6	0.05	1.4	0	3.77	3.73	99.0	0.04	1.0	0	4.34	4.34	100	0.00	0.0	4.0	2.57	2.57	100	0.00	0.0	4.35

Glucose und Malat 60-70 % des Kohlenstoffes der Glucose in Milchsäure wiederzufinden ist. Er nimmt an, daß Malat die Aktivität der L-Lactatdehydrogenasen regelt und bei *Leuconostoc mesenteroides* eine relative Förderung hervorruft. Darauf führt er die vermehrte Bildung von L-Lactat aus Glucose bei gleichzeitigem Malatabbau zurück. Nach den Untersuchungen von Gunsalus, Gibbs, De Moss (vergl. Wood 1961), ist aber bei *Leuconostoc* eine mehr als 50 %ige Beteiligung des Kohlenstoffes der Glucose an der Milchsäurebildung nicht möglich. Die von Doelle (1971) berichteten Daten sind nur dann verständlich, wenn bei *Leuconostoc* noch andere Möglichkeiten des Glucoseabbaues bestehen würden, z.B. eine Umwandlung von Pentosephosphat in andere Zucker mit Hilfe der Transaldolase- und Transketolasereaktion, so daß mehr als ein Mol Triose und damit auch Lactat pro Mol Pentose entstehen kann. Es wurde daher der Einfluß von Malat auf die Glucosevergärung noch einmal ausführlich untersucht.

I.b.1. Der Einfluß von Malat auf den "molaren ökonomischen Koeffizienten" (molar growth yield) der Glucosevergärung bei *Leuconostoc mesenteroides*.

Die bei der Vergärung von einem Mol Substrat erzeugte Bakterienmasse hängt von der beim Abbau erzeugten Menge an ATP ab, d.h. sie ist abhängig vom Abbauweg. In der Tabelle 2 sind die theoretischen Y_{Glucose} - und die Y_{ATP} -Werte für verschiedene Abbauwege der Glucose zusammengestellt. Der Y_{Glucose} -Wert gibt die pro Mol verbrauchter Glucose erzeugte Bakterienmasse an, der Y_{ATP} -Wert die pro Mol gebildeten ATP erzeugte Bakterienmasse.

Wie man aus der Tabelle ersieht, liefert die homofermentative Milchsäuregärung aus einem Mol Glucose 20 g Bakterientrockengewicht beim Abbau nach dem Emden-Meyerhof-Weg, aber nur 10 g Bakterientrockengewicht im Falle des Entner-Doudoroff-Weges. Bezogen auf den Netto-ATP-Gewinn ergibt

Tab.2: ATP-Gewinn, Y_{Glucose} und Y_{ATP} für verschiedene Abbauege der Glucose. (Ergänzt nach Senez, Bact.Reviews 23/26, 1961/1962)

Abbaueweg	Netto-ATP-Gewinn Mol/Mol	Y_{Glucose} mg/mmol	Y_{ATP} mg/mmol
<u>Homofermentierende Milchsäuregärung:</u>			
1 mol Glucose $\rightarrow$ 2 mol Lactat			
a) Abbau nach Emden-Meyerhof	2	20	10
b) Abbau nach Entner-Doudoroff	1	10	10
<u>Heterofermentierende Milchsäuregärung:</u>			
<u>1. anaerob: Pentosephosphatweg:</u>			
1 mol Glucose $\rightarrow$ 1 mol CO_2 + 1 mol EtOH + 1 mol Lactat	1	10	10
<u>2. aerob: Pentosephosphatweg:</u>			
1 mol Glucose $\rightarrow$ 1 mol CO_2 + 1 mol Acetat + 1 mol Lactat	2	20	10
<u>Alkoholische Gärung:</u>			
1 mol Glucose $\rightarrow$ 2 mol EtOH + 2 mol CO_2	2	20	10
<u>Aerobe Oxidation in Leber oder Muskel:</u>			
Glucose + 6 $\text{O}_2 \rightarrow$ 6 CO_2 + 6 H_2O	38		
<u>Oxidative Phosphorylierung in Leber oder Muskel:</u>	3		

sich jedoch in beiden Fällen ein Wert von 10 g Trockengewicht pro Mol produzierten ATP.

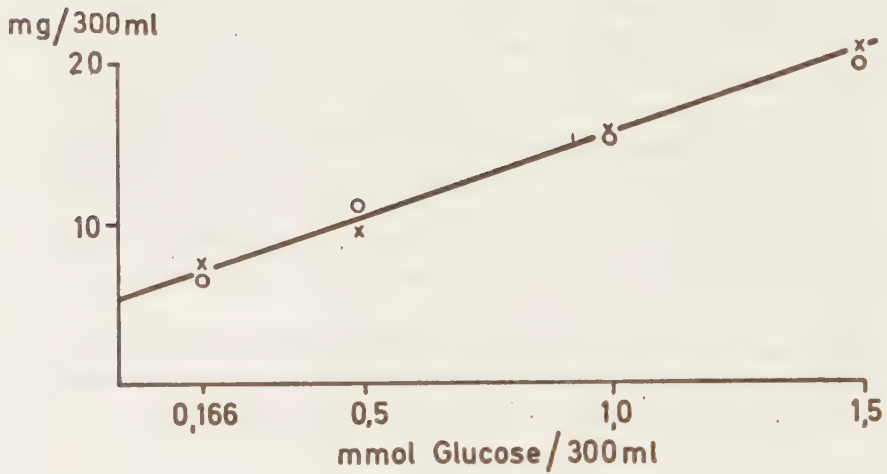
Bei der heterofermentativen Milchsäuregärung über den Pentosephosphatweg ergibt sich beim Abbau der Glucose unter anaeroben Bedingungen für Y_{Glucose} und für Y_{ATP} der gleiche Wert von 10 g/mol, da ja nur ein ATP-Gewinn von einem Mol ATP pro Mol Glucose resultiert. Unter aeroben Bedingungen erhält man 20 g Bakterientrockengewicht pro Mol verbrauchter Glucose und dementsprechend 2 Mol ATP. Dieser Energiegewinn resultiert aus der Spaltung von Acetylphosphat zu Essigsäure, da wegen der Übertragung von Wasserstoff auf Luftsauerstoff eine Reduktion des Acetylphosphates zu Äthylalkohol nicht nötig ist. Beispiele hierfür sind in Kapitel II noch näher beschrieben.

Allgemein wird experimentell für Y_{ATP} ein Wert von rund 10.5 g Bakterientrockengewicht/Mol gebildetem ATP gefunden (Gunsalus und Shuster, 1961; Stouthamer, 1969).

Wenn nun, wie Doelle (1971) angibt, bei *Leuconostoc mesenteroides* in Anwesenheit von Malat mehr als 50 % des Kohlenstoffes der Glucose in Lactat übergeführt wird, bzw. die Malatverwertung mit einem Energiegewinn verbunden ist, dann müßte auch eine bessere Ausbeute an Zellrockengewicht für die Glucosevergärung bei Anwesenheit von Malat erwartet werden.

Die Daten der Abbildung 1 zeigen jedoch, daß die aus Glucose gebildete Zellmasse in einem Bereich von 0,15 bis 1.5 mmol pro 300 ml Nährlösung mit und ohne Zusatz von Malat gleich ist. Aus der Kurve errechnet sich in beiden Fällen ein Y_{Glucose} von 10.1 mg/mmol. Der verwendete Stamm *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 bildet als C_2 -Stück auch aerob Äthylalkohol und nur Spuren von Acetat, so daß pro mol Glucose nur ein mol ATP entsteht. Daher errechnet sich für Y_{ATP} ebenfalls ein Wert von 10.1.

Abb.1: Abhängigkeit der gebildeten Zellmasse (Trockengewicht) von der Glucosekonzentration des Mediums und vom Malatzusatz bei *Leuconostoc mesenteroides* 39 (ATCC 12291).



X = mit Glucose

o = mit Glucose + 1 % D/L-Malat.

(Die Bestimmung erfolgte aus 300 ml MRS ohne Citrat und Acetat, bebrütet bei 30°C in hoher Schicht ohne Belüftung.)

Der Malatabbau geschieht hier mit dem eingangs erwähnten zweiten Typ von Malatenzym, dem Malo-Lactat-Enzym, durch welches Malat in CO_2 und L-Lactat abgebaut wird, ohne daß dabei ein Energiegewinn zustande kommt.

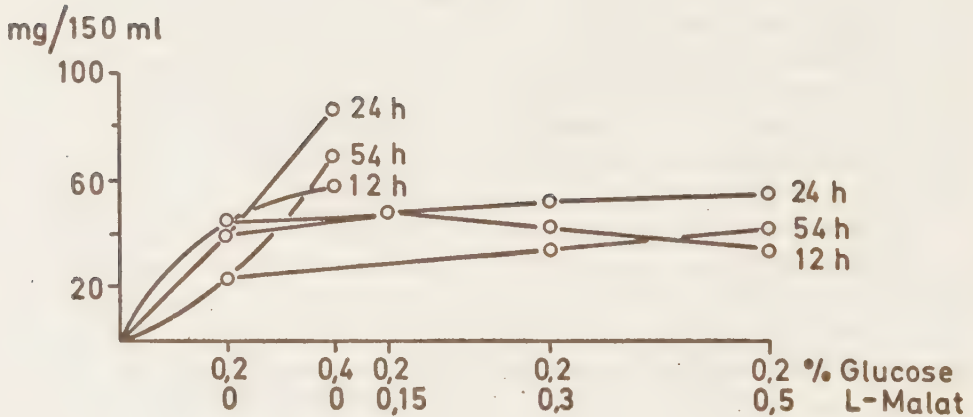
I.b.2. Der Einfluß von Malat auf den "molaren ökonomischen Koeffizienten" ("molar growth yield") der Glucosevergärung bei anderen Lactobacillen.

Wie bei *Leuconostoc* gezeigt wurde, ergibt sich kein Einfluß von Malat auf die Energiebilanz der Glucosevergärung. Beide Substrate werden unabhängig voneinander vergoren, wobei die Malatvergärung keinen Energiegewinn bringt. London et al. (1970, 1971a), sowie Schütz und Radler (1974) fanden, daß einige Stämme von *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus casei* nach Adaptation auf Äpfelsäure als einziger Energiequelle wuchsen, d.h. daß sie Malat mit Energiegewinn verwerten können. Verantwortlich dafür ist vermutlich die zu Beginn erwähnte erste Art von Malatenzym, welche intermediär aus L-Malat Pyruvat liefert (Schütz und Radler, 1974). Dieses Pyruvat kann nicht nur zu Milchsäure reduziert werden, wie im Falle des "Malolactat-Enzymes", sondern es kann auch zu Acetat und CO_2 abgebaut werden. Dabei wird zusätzlich Energie in Form von ATP gewonnen.

Um die Verwendung von Malat für das Wachstum bei verschiedenen Streptobakterien zu zeigen, wurden "Growth-Yield-Bestimmungen" durchgeführt, bei denen die Nährlösung eine für das Wachstum begrenzende Menge an Glucose und zusätzlich einen Überschuß an Malat enthielt.

Beim Versuch in Abbildung 2 wurden Parallelproben jeweils nach 12, 24 und 54 Stunden geerntet, um die maximale Substanzproduktion zu erfassen.

Abb.2: Zelltrockengewichtsausbeute bei *Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens* DSM 20005 aus glucose- und glucose- + malathaltigem Medium.



Sämtliche Kolben wurden mit einer bereits mindestens dreimal weitergeimpften Übernachtskultur 1%ig angeimpft und anschließend in Stickstoffatmosphäre bei 30°C bebrütet. Wie man aus der Abb. 2 entnehmen kann, sind 0,2 % Glucose bereits nach 12 h aufgebraucht und man erhält den Maximalwert für das Zelltrockengewicht, entsprechend dem maximalen Y_{Glucose} -Wert von 28,3 mg/mmol. Im Ansatz mit 0,4 % Glucose ist nach 12 h die eingesetzte Glucose noch nicht verbraucht, was aus dem nichtlinearen Verlauf der Kurve und aus der weiteren Zunahme des Trockengewichtes bei längerer Bebrütungszeit hervorgeht. Nach 24 h aber ist auch hier die Glucose quantitativ aufgebraucht und man erhält das maximal erreichbare Zelltrockengewicht, entsprechend einem Y_{Glucose} -Wert von 28,5 mg/mmol. Das Zelltrockengewicht im Ansatz mit 0,2 %

Glucose ist jedoch nach 24 h Bebrütungsdauer im Vergleich zu 12 h Bebrütungsdauer schon leicht abgefallen. Der Y_{Glucose} -Wert beträgt nur noch 26,3 mg/mmol. Nach 54 h beobachtet man bei beiden in den Versuch eingesetzten Glucosekonzentrationen eine starke Abnahme des Zelltrockengewichtes, die wahrscheinlich auf den Erhaltungsstoffwechsel zurückzuführen ist.

Wie weiterhin aus der Abb.2 hervorgeht, hat L-Malat einen deutlichen Einfluß auf die Trockengewichtsausbeute. Nach 12 h bewirkt nur der niedrigste Zusatz von Malat (0,15 %) eine geringe Steigerung, während die höheren Malatkonzentrationen hemmend wirkten. Dagegen bewirken alle Malatkonzentrationen bei 24-stündiger und bei 54-stündiger Bebrütung eine signifikante Steigerung des Zelltrockengewichtes, so daß sich nach Abzug des durch die Glucose verursachten Zuwachses ein Y_{Malat} -Wert errechnen läßt. Er beträgt für die 24-h-Bebrütung 2,5 mg/mmol und für die 54-h-Bebrütung sogar 3,3 mg/mmol. Der letzte Wert ist allerdings sehr fragwürdig, da der für die Differenzbildung benötigte Y_{Glucose} -Wert schon stark durch den Erhaltungsstoffwechsel beeinflusst ist.

Man kann natürlich im Zweifel sein, ob die erhöhte Trockengewichtsausbeute in Gegenwart von Malat auf einem Energiegewinn aus Malat oder auf einer energetisch besseren Ausbeute der Glucose beruht. Da aber für Glucose ohnehin der theoretisch erwartete Maximalwert von 20 g/mol schon überschritten wurde, ist anzunehmen, daß eine weitere Steigerung nicht auf eine bessere Glucoseverwertung zurückzuführen ist, sondern aus einem Energiegewinn der Malatvergärung resultiert.

Daher sollten zunächst weitere "Growth yield-Bestimmungen" in ähnlicher Weise wie oben auch mit anderen Streptobakterien durchgeführt werden, um eine Aussage über die Malatverwertung innerhalb dieser Gruppe machen zu können. In der Tabelle 3 sind die Y_{Glucose} - und die Y_{Malat} -Werte von weiteren Streptobakterien zusammengestellt. Für die Bestimmung von Y_{Glucose} wurden in Glucose vorkultivierte, für die Bestimmung von Y_{Malat} wurden in Glucose + Malat kultivierte Zellen verwendet.

Tab.3: Y_{Glucose} - und Y_{Malat} -Werte glucose- und glucose- + malatgewachsener Streptobakterien

Anzuchtmedium: 150 ml MRS -Citrat -Acetat + ---	Y_{Glucose} + 0.2 % Glucose + ---		+ 0.4 % Glucose + ---		+ 0.2 % Glucose + 0.15% L-Malat + 0.3% L-Malat		+ 0.2 % Glucose + 0.3% L-Malat + 0.5 % L-Malat	
	Y_{Glucose}		Y_{Glucose}		Y_{Malat}		Y_{Malat}	
Stamm	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob
<i>L.coryniformis</i>	21.3	28.3	21.2	28.5	2.96	2.59	4.13	3.40
<i>L.sake</i>	9.04	8.4	0	10.5	2.50	3.23	0	3.90
<i>L.casei pseudopl.</i>	30.7	26.9	0	24.9	0	0	0	3.5
<i>L.casei rhamnosus</i>	32.4	30.0	0	0	0.00	0.00	0	0
<i>L.casei</i> 393	27.1	27.8	26.9	0	0.00	0.00	0.00	0
<i>L.xylosus</i> 15577	20.4	0	0	0	1.42	0.00	0	0
<i>L.plantarum</i> 14917	31.2	26.5	0	0	0.65	0.50	0	0
<i>L.curvatus</i> 8	9.04	11.9	0	12.0	0.00	1.25	0	0.50
							0.00	0.00
							0.25	0.00
							1.30	1.36
							0.00	0.98

Bebrütungsdauer: 22-26 h bei 30°C, anaerob unter Stickstoff oder aerob auf der Schüttelmaschine

Beimpfung: 1 %ig mit MRS-Übernachtskultur

Die Stämme *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus casei*, ssp. *pseudoplantarum* verwerten sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen Malat mit Energiegewinn. Bei *Lactobacillus xylosus* führte Malat nur aerob, bei *Lactobacillus curvatus* nur anaerob zu einer vermehrten Produktion von Zellmasse.

Nimmt man an, daß pro Mol Malat 1 Mol ATP gebildet wird, so müßte man eine Produktion von 10 g Zelltrockengewicht pro Mol verbrauchtem Malat erwarten. Die tatsächlich gefundenen, sehr viel niedrigeren Werte (1,5-3 g/mol) sprechen dafür, daß nur ein Teil des Malats unter Energiegewinn, ein anderer Teil aber ohne Energiegewinn, vermutlich mit dem Malo-Lactat-Enzym abgebaut wurde.

Die Y_{Glucose} -Werte der untersuchten Stämme schwanken zwischen 10 und 30 g/mol, weichen also sehr stark vom erwarteten Wert (20 g/mol) für die Homolactatfermentation ab. Während sich für die zu geringen Y_{Glucose} -Werte zur Zeit keine Erklärung geben läßt, könnten die zu hohen Werte durch eine zusätzliche Acetatbildung erklärt werden. Daher wurden verschiedene Vertreter der Untergattung *Thermobacterium*, *Streptobacterium* und *Betabacterium* zur Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" herangezogen, wobei auch das gebildete Acetat bestimmt wurde. Dadurch lassen sich die Y_{ATP} -Werte korrigieren, wenn man davon ausgeht, daß für die Spaltung von 1 Mol Pyruvat zu 1 Mol Acetat + 1 Mol Formiat bzw. 1 Mol CO_2 1 Mol ATP zusätzlich entsteht.

In der Tabelle 4 sind sämtliche "Growth yield"-Bestimmungen und die entsprechenden Y_{ATP} -Werte zusammengefaßt. In allen Fällen betrug das gebildete Acetat weniger als 1 % der entstandenen Milchsäure. Damit scheidet eine Acetatbildung als zusätzliche ATP-Quelle und damit als Ursache für besonders hohe Y_{Glucose} -Werte aus.

Tab.4: Y_{Glucose} - und Y_{ATP} -Werte verschiedener Lactobacillen.

Unter- gattung	Species	Bezeich- nung	Wachs- tums- zeit: h	Y_{Glucose}		Y_{ATP}	
				aerob	anaerob	aerob	anaerob
Thermo- bakterium	L.acidophilus	AM 63	24	18.0	16.8	9.0	8.4
	L.lactis	20072	25	14.4	21.3	7.2	10.65
	L.bulgaricus	3 Whst.	24	22.5	21.0	11.2	10.5
Streptobakterium	L.casei	393	20	27.7	27.9	13.8	13.9
	L.coryniformis	20005	24	28.9	25.1	14.4	12.5
	L.casei pseudopl.	20008	30	30.9	30.3	15.4	15.2
	L.casei rhamnosus	7469	30	32.5	30.1	16.2	15.0
	L.curvatus	8	30	9.1	12.0	4.5	6.0
	L.plantarum	14917	24	29.3	30.9	14.6	15.4
	L.plantarum arabinosus	19a	24	31,2	32.8	15.6	16.4
	L.sake	112	30	9.0	10.5	4.5	5.2
	L.xylosus	15577	24	25.3	20.5	12.6	10.2
Beta- bakter.	L.reuteri, Typ II	20016	25	0.00	8.15	0.00	8.15
	Leuconostoc mes.	10091	24	9.60	9.40	9.60	9.40

Die Tabelle 4 zeigt, daß die Vertreter der Untergattung *Thermobakterium* die erwarteten Werte von $10 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ pro Mol ATP lieferten, während sich bei den *Streptobakterien* allgemein ein um 40-50 % zu hoher Wert ergab. Lediglich in zwei Fällen, nämlich bei *Lactobacillus curvatus* und bei *Lactobacillus sake* ergab sich die Hälfte der erwarteten Ausbeute. Der einzige untersuchte Vertreter der *Betabakterien* lieferte den theoretisch für eine heterofermentative Milchsäuregärung erwarteten Wert von 10 g pro Mol verbrauchten Substrates.

Ein Einfluß von Sauerstoff auf die Y_{Glucose} -Werte war nicht festzustellen, es trat in keinem Fall eine Förderung ein. Bei *Thermobakterien* wirkt er eher hemmend.

I.b.3. Der Einfluß von Malat auf die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung bei *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291.

Malatadaptierte Zellen (erhalten durch zweimaliges Überimpfen in MRS + 2 % D/L-Malat) und glucoseadaptierte Zellen (Anzucht in MRS) wurden sowohl in MRS als auch in MRS+ 2 % D/L-Malat überimpft und das Wachstum durch Trübungsmessung, pH-Bestimmung und Milchsäurebestimmung verfolgt. In der Abbildung 3a ist die Wachstumsgeschwindigkeit und die pH-Änderung, in der Abbildung 3b die Milchsäurebildung von malatadaptierten Zellen dargestellt. Ähnliche Kurven ergeben sich für glucoseadaptierte Zellen.

Abb. 3a: Wachstumsgeschwindigkeit und pH-Änderung des Mediums bei Wachstum von *L.mesenteroides* 39 in MRS-Medium (ohne Citrat und Acetat) mit und ohne Zusatz von 2 % DL-Malat. Substratkonzentrationen: L-Malat = 70 $\mu\text{mol/ml}$ (ebenso D-Malat); D-Glucose = 111 $\mu\text{mol/ml}$.

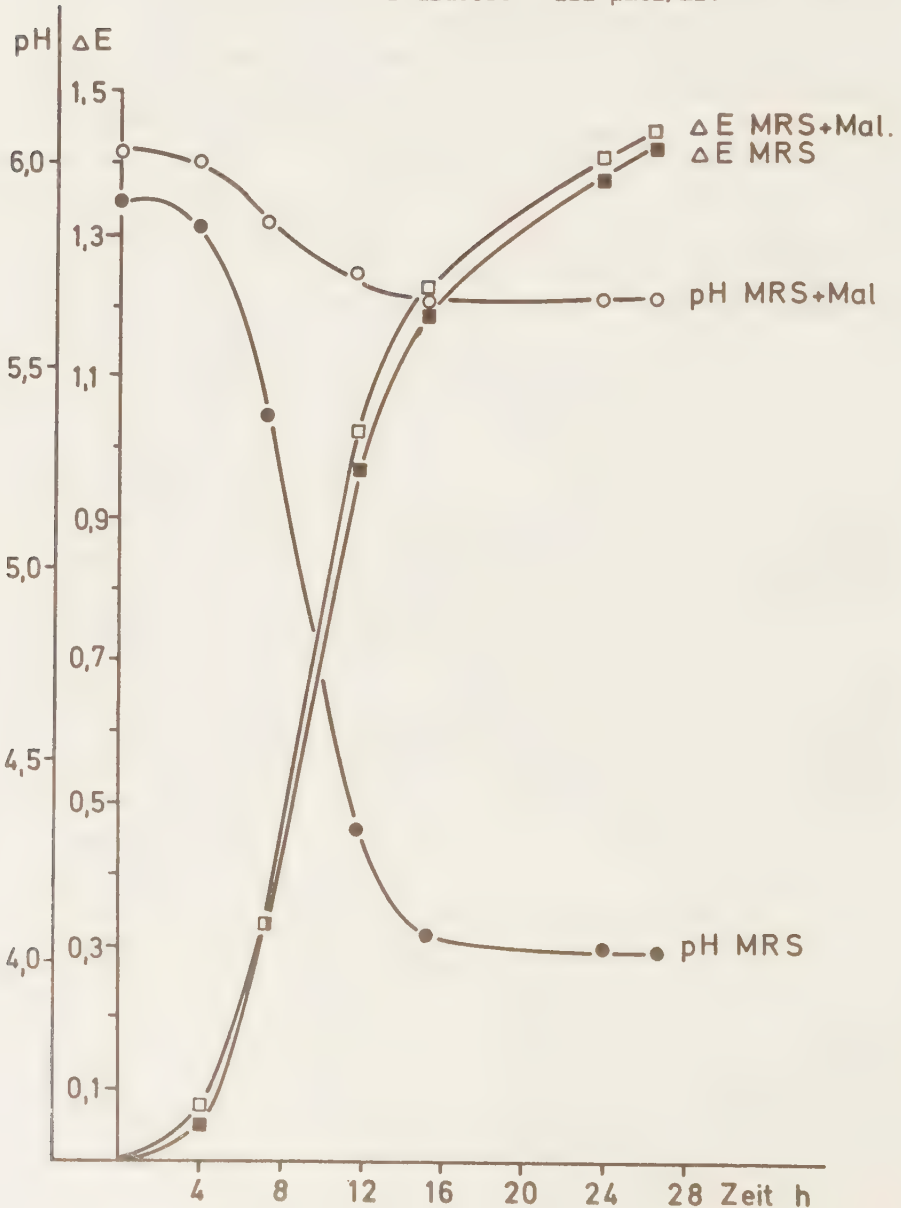
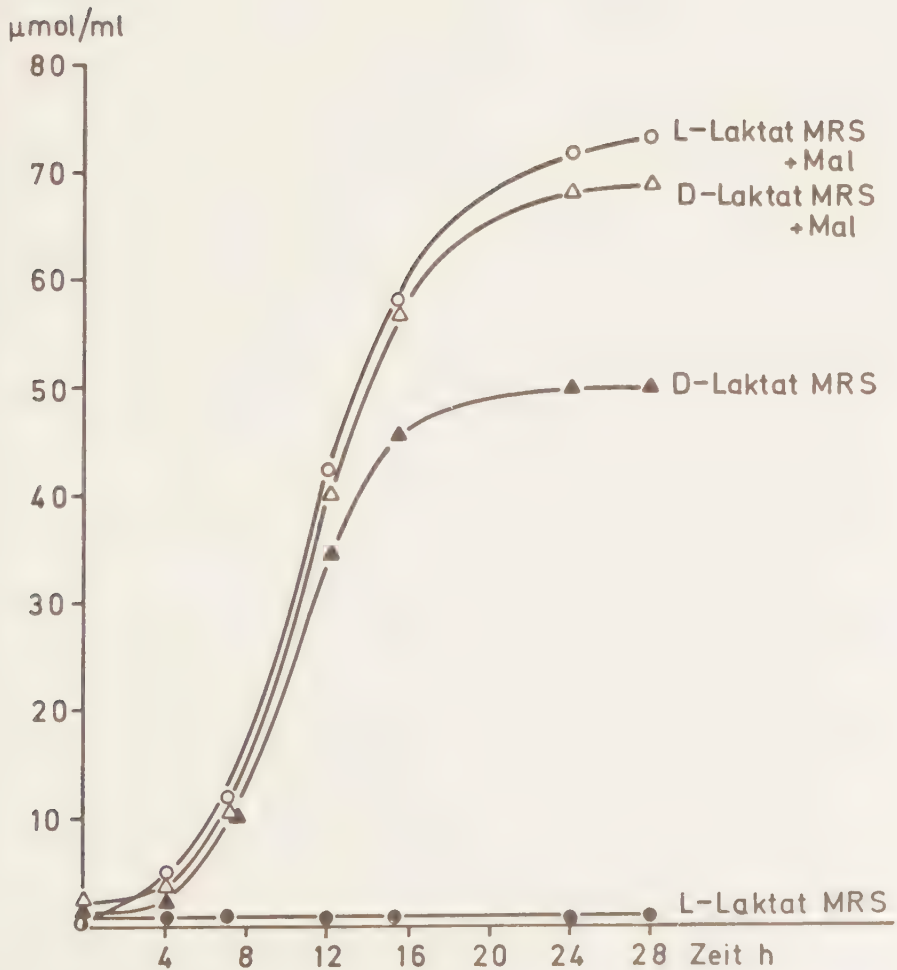


Abb.3b: Lactatbildung während des Wachstums von *Leuconostoc mesenteroides* 39 (= ATCC 12291) in MRS-Medium (ohne Citrat und Acetat) mit und ohne Zusatz von 2 % D/L-Malat.



Wie die Abbildung 3b zeigt, hält die Lactatbildung bei Malatzusatz länger an, so daß eine erhöhte Menge an D(-)-Lactat entsteht. Außerdem wird in MRS + 2 % D/L-Malat zusätzlich L(+)-Lactat entsprechend der zugesetzten Menge an L-Malat gebildet. Die vermehrte D-Lactatbildung ist auf den durch den Malatabbau veränderten pH-Verlauf zurückzuführen (Abbildung 3a). Durch den Abbau von L-Malat zu L-Lactat und CO_2 erfolgt eine Verminderung der Säuregruppen - eine Säuregruppe des Malats entweicht als CO_2 -, so daß der pH-Wert durch die Milchsäurebildung aus Glucose nicht auf 4,2, sondern nur auf 5,7 abfällt. Daher wird die Gärung nicht wie üblich durch den pH-Wert gehemmt, sondern kann weiter fortgesetzt werden, obwohl das Wachstum vermutlich durch Erschöpfung wichtiger Nährbodenbestandteile etwa gleichzeitig mit der malatfreien Kontrolle aufhört. Diese Entkopplung von Wachstum und Glycolyse durch Begrenzung von Ernährungsfaktoren ist besonders aus den Versuchen der Bestimmung der "molar growth yield" bekannt (Gunsalus und Shuster, 1961). Die Rückbestimmung der Glucosemenge des Mediums nach 28 h Wachstumszeit ergab für die Probe ohne Malat einen Verbrauch von 50 $\mu\text{mol/ml}$ und für die malathaltige Probe einen solchen von 69 $\mu\text{mol/ml}$. Die gebildete Menge an D-Milchsäure stimmt damit überein.

I.b.4. Der Einfluß von Malat auf die Isotopenverteilung bei Vergärung von Glucose- ^{14}C und Malat- ^{14}C .

Zunächst wurde durch Vergärung uniform markierter Glucose durch ruhende Kulturen in Pufferlösung und durch wachsende Kulturen in MRS-Lösung (Acetat und Citrat durch Phosphatpuffer ersetzt) untersucht, ob durch Malatzusatz eine Veränderung der Gärbilanz - vermehrte Milchsäure- oder Acetatbildung - erzielt wird. In anderen Versuchen wurden die Gärprodukte nicht mit Hilfe von Isotopen, sondern enzymatisch bestimmt. Es ergab sich das zu erwartende Molverhältnis von CO_2 : Milchsäure : Äthanol von 1 : 1 : 1; auch Acetat war in geringen Mengen nachzuweisen, da die Vergärung nicht 100 %ig anaerob ausgeführt wurde. Die Analysendaten der enzymatischen Gärproduktbestimmung sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab.5: Gärbilanz für Glucose, Glucose + Malat und Malat für glucose- und malat-adaptierte Zellen von *Leuconostoc mesenteroides* AFCC 12991 (39).

Substrat μmol	CO ₂ μmol	EtOH μmol	Acetat μmol	D- Lactat μmol	L- Lactat μmol	Ges. Lactat μmol	glu. μmol	Mal. μmol
<u>glucose-adapt.</u>								
Glucose 40 μmol	37	27.9	9.7	37.9	0.3	38.2	0.0	0
Glucose+L-Malat 40+45	41.7	28.0	11.5	39.4	5.2	44.6	0.0	0
Glucose+L-Malat 40+45	48.2	48.5	5.9	40.5	11.3	51.8	0.0	0
<u>malat-adapt.</u>								
Glucose 40 μmol	38.1	25.9	8.3	39.6	0.27	39.9	0.0	0
Glucose+L-Malat 40+45	75.5	24.3	8.3	39.9	54.0	93.8	0.0	0.0
L-Malat 45 μmol	35.6	0.1	4.0	0.0	59.0	59.0	0	0.0

Die Vergärung der Substrate erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,5. Die Bilanz der Glucosevergärung liefert nahezu die theoretischen Werte, während im Falle der Vergärung von Glucose + Malat und von Malat ein Defizit an CO_2 festzustellen ist. Da bei diesen Versuchen der pH-Wert bei der Vergärung keine oder nur eine geringe Veränderung erfährt und nach der Vergärung auch nicht angesäuert wurde, das CO_2 aber bei pH = 6,5 zu 20-30 % als Bicarbonat in Puffer zurückgehalten wird, läßt sich der Fehlbetrag leicht erklären. Malatadaptierte Zellen vergären auch bei Gegenwart von Glucose Malat sehr rasch, so daß im Beobachtungszeitraum von 3,5 Stunden das Malat quantitativ verbraucht wird. Glucoseadaptierte Zellen vergären Malat in Gegenwart von Glucose nur langsam. Während der Versuchsdauer von 3,5 Stunden wurden nur ca. 10 % der zugesetzten Menge umgesetzt.

Die Tabelle 6 zeigt die Isotopenverteilung auf die Gärprodukte, wenn Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$ mit und ohne nichtmarkiertem L-Malat vergoren wurde. Es zeigt sich kein Einfluß von Malat auf die Glucosevergärung. Umgekehrt führt auch die Vergärung von unmarkierter Glucose gleichzeitig mit markiertem L-Malat zu keiner Veränderung der Isotopenverteilung innerhalb der aus Malat gebildeten Produkte L-Milchsäure und CO_2 .

In einem weiteren Versuch, dessen Ergebnisse in Tabelle 7 zusammengefaßt sind, wurden verschieden positionsmarkierte Glucosen mit und ohne Zusatz von Malat in MRS (ohne Citrat und Acetat) während des Wachstums vergoren. Auch hier ergibt sich kein Einfluß des Malats auf die Isotopenverteilung unter den Gärprodukten. Wie zu erwarten ist, wird aus C-1 der Glucose praktisch nur CO_2 , aus C-2 nur Äthylalkohol und wenig Acetat und aus C-6 nur Milchsäure gebildet.

Tab.6: Einfluß von Malat auf die Isotopenverteilung bei Vergärung von Glucose-U-¹⁴C in Puffer oder MRS-Medium (ohne Citrat und Acetat)

Gärungsbedingungen und Substrate	Gebildete Produkte									Ausbeute %
	CO ₂		Lactat		Acetat		Alkohol			
	Ipmx 10 ⁻³	%An-teil	Ipmx 10 ⁻³	%An-teil	Ipmx 10 ⁻³	%An-teil	Ipmx 10 ⁻³	%An-teil		
in Puffer +Glucose-U- ¹⁴ C ^a	179	16,3	559	51,1	18	1,6	339	30,9	102,2	
	178	16,4	560	51,7	13	1,2	333	30,7	101,2	
in MRS +Glucose-U- ¹⁴ C ^b	176	15,6	550	49,0	26	2,4	369	32,9	92,6	
	180	15,3	604	51,5	37	3,2	350	29,9	96,7	
in Puffer + Glucose ^c in Puffer ohne Glucose ^d	190	24,8	573	74,9	1	0,2	0,7	0,09	96,5	
	193	25,3	570	74,6	0		0		96,2	

a = 20 ml Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 6,3; 1 ml Bakteriensuspension = 0,3 ml Zellvolumen; Glucose-U-¹⁴C: 0,12 mmol = 1071 × 10³ Ipm; (L-Na-Malat: 0,12 mmol); t = 30°C; Versuchsdauer 4 Stunden.
b = 20 ml MRS-Medium ohne Acetat, ohne Citrat und ohne Glucose; 1 ml Bakteriensuspension = 0,0006 ml Zellvolumen; Glucose-U-¹⁴C: 0,12 mmol = 1210 × 10³ Ipm; (L-Na-Malat: 0,12 mmol); t = 30°C; Versuchsdauer 14 Stunden.
c = Wie bei a, aber Glucose: 0,12 mmol; L-Na-Malat-U-¹⁴C: 0,12 mmol = 793 × 10³ Ipm.
d = Wie bei c, aber keine Glucose.

Tab.7: Einfluß von Malat auf die Isotopenverteilung bei Vergärung positionsmarkierter Glucose während des Wachstums im MRS-Medium.

Substrat	Gebildete Produkte										Aus- beute %
	CO ₂				Lactat		Acetat		Alkohol		
	Ipmx 10-3	%An- teil	Ipmx 10-3	%An- teil	Ipmx 10-3	%An- teil	Ipmx 10-3	%An- teil	Ipmx 10-3	%An- teil	
Glucose-1- ¹⁴ C ^a	- Malat	843	99,7	0,68	0,08	1,7	0,2	0			95,96
	+ Malat	800	99,7	0,68	0,08	0,11	0,01	1,4	0,17		91,08
Glucose-2- ¹⁴ C ^b	- Malat	0,47	0,06	0,77	0,1	12	1,7	705	98,0		97,46
	+ Malat	0,10	0,01	0,43	0,06	8	1,1	712	98,8		97,68
Glucose-6- ¹⁴ C ^c	- Malat	0,15	0,02	660	98,9	3	0,54	3,6	0,54		97,28
	+ Malat	0,16	0,02	683	98,9	4	0,59	2,8	0,40		100,61

a = 20 ml MRS ohne Acetat, ohne Citrat und ohne Glucose; 1 ml Bakteriensuspension = 0,0006 ml Zellvolumen; Glucose-1-¹⁴C: 0,12 mmol = 881 × 10³ Ipm; (L-Na-Malat: 0,12 mmol); t = 30°C; Versuchsdauer 14 Stunden.
b = Wie a, jedoch mit Glucose-2-¹⁴C: 0,12 mmol = 737 × 10³ Ipm.
c = Wie a, jedoch mit Glucose-6-¹⁴C: 0,12 mmol = 685 × 10³ Ipm.

I.c. Der Malatabbau durch *Lactobacillus plantarum*

Korkes und Ochoa haben bereits 1948, Nossal (1951) und Jolchine (1959) etwas später den Abbau von Malat zu L-Lactat und CO_2 untersucht. Seither wurde *Lactobacillus plantarum*, ssp. *arabinosus* zur Bestimmung der Verteilung der Markierung in Malat, z.B. im Falle des diurnalen Säurestoffwechsels der Succulenten (Crassulacean Acid Metabolism = CAM).

Neuerdings jedoch zogen Sutton und Osmond (1972) die Zuverlässigkeit der Bestimmung der Isotopenverteilung in Malat mit *Lactobacillus plantarum* ssp. *arabinosus* in Zweifel. Sie beobachteten bis zu 40 % Fehlbeträge und stellten daher sämtliche mit *Lactobacillus arabinosus* ermittelten Aktivitätsverteilungen in Malat aus dem CAM in Frage.

Daher schien es notwendig, den Malatabbau von *Lactobacillus plantarum* unter den von Sutton und Osmond (1972) verwendeten Bedingungen erneut zu untersuchen.

Verwendet wurden dazu zwei Stämme, nämlich *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 und *Lactobacillus plantarum* ssp. *arabinosus* 8014. Die Anzucht erfolgte in MRS ohne Citrat und Acetat, aber mit einem Zusatz von 2 % D/L-Malat. Die Stämme wuchsen in diesem Medium sehr gut und bildeten etwa doppelt so viel Milchsäure wie in MRS, da zusätzlich Malat abgebaut wurde. Das Isomerenverhältnis wurde durch den Malatzusatz nicht beeinflusst; es wurde nur D/L-Lactat gebildet.

I.c.1. Abhängigkeit der Gärbilanz von L-Malat von verschiedenen Versuchsbedingungen.

Sutton und Osmond (1972) hatten gefunden, daß aus Malat- $\text{U-}^{14}\text{C}$ beim Abbau mit *Lactobacillus plantarum* erheblich mehr als die theoretisch zu erwartenden 25 % der Gesamtaktivität als CO_2 freigesetzt wird und sie glaubten daher, daß bei Ver-

wendung dichter Bakteriensuspensionen ein Abbau der aus Malat gebildeten L-Milchsäure erfolgt. Wir führten daher die Vergärung von Malat in Phosphatpuffer in Warburggefäßen mit sehr unterschiedlich dichten Bakteriensuspensionen durch. Nachdem auch bei dem Ansatz mit der schwächsten Bakterienkonzentration die Gasentwicklung beendet war, wurde das in Puffer als Bicarbonat gelöste CO_2 durch Säurezugabe ausgetrieben und aus der Gesamtdruckdifferenz die CO_2 -Menge berechnet. Im Überstand wurde die gebildete Milchsäure enzymatisch bestimmt.

Wie die Tabelle 8 zeigt, bilden alle vier Proben die gleiche Menge CO_2 , obwohl die dichten Suspensionen sehr viel länger inkubiert waren, als zur Decarboxylierung des Malats notwendig war und daher auf jeden Fall Milchsäure hätten spalten müssen, falls sie dazu in der Lage gewesen wären. Die Gesamtlactatmenge liegt etwas höher, als auf Grund der Menge an Malat zu erwarten war, da auch geringe Mengen an Lactat aus endogenem Material gebildet wurden.

Tab.8: Gärbilanz für L-Malat mit unterschiedlicher Bakterien-
dichte von *Lactobacillus plantarum*, ssp. *arabinosus* 8014
in 0,1 m Phosphatpuffer (pH = 5.7).

L-Malat μmol	pH	Bakt.- masse (mg)	CO_2 μmol	L- Lactat μmol	D- Lactat μmol	Ges.- Lactat μmol	H_2SO_4 -Zu- gabe am Versuchs- ende
40	5.7	50	41,2	26,1	20,3	46,4	+
40	5.7	25	40,6	23,8	18,4	42,2	+
40	5.7	10	40,7	23,3	17,3	40,6	+
40	5.7	5	40,0	24,6	16,9	41,5	+

Als weitere Variationen wurden Änderungen des pH-Wertes und der eingesetzten Substratkonzentrationen vorgenommen. Die Resultate zeigt Tabelle 9.

Tab.9: Gärbilanz von *Lactobacillus plantarum* 14917 und *Lactobacillus plantarum* ssp. *arabinosus* 8014 für unterschiedliche Malatkonzentrationen und unterschiedliche pH-Werte des verwendeten Puffers.

L-Malat μmol	Anfangs- pH-Wert	Bakt. masse mg	CO_2 μmol	L-Lactat μmol	D-Lactat μmol	Ges.- Lactat μmol	Organismus
22,5	6,5	50	21,5	13,0	11,4	24,4	L.pl.ara.
30	6,5	50	28,6	20,0	15,5	35,5	L.pl.ara.
30	5,7	50	30,6	18,8	17,2	36,0	L.pl.ara.
60	5,7	50	0	39,5	22,0	61,5	L.pl.14917
300	4,2	50	303	176	147	323	L.pl.ara.
400	4,0	50	398	208	196	404	L.pl.ara.
85	6,4	45	83,4	41,8	45,3	87,2	L.pl.ara.
85	6,4	45	84,3	49,4	38,9	88,3	L.pl.14917

Die in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengestellten Gärbilanzen zeigen, daß bei genügender Pufferung weder die Bakterien-dichte, noch die Substratkonzentration, noch der pH-Wert einen Einfluß auf die Menge der Gärprodukte ausüben. Die Gärung läuft unter sämtlichen angeführten Bedingungen vollständig ab, wobei man aber, um die CO_2 -Produktion quantitativ zu erfassen am Ende der Vergärung ansäuern muß.

Der Befund von Sutton und Osmond (1972), daß bei Vergärung von mehr als 20 μmol Malat-4- ^{14}C pro 10 mg Bakterientrockengewicht die Markierung aus der Carboxylgruppe des Malats beim Abbau zu Milchsäure und CO_2 nicht quantitativ in CO_2 gefunden wird, konnte durch unsere Versuche mit nichtmarkiertem L-Malat nicht bestätigt werden.

Die Vergärung von Malat-U- ^{14}C mit *Leuconostoc mesenteroides* (siehe Kapitel I.b.4.) lieferte die erwartete Verteilung der Aktivität von 75 % in C-1 bis C-3 und 25 % in C-4. Dasselbe Verteilungsmuster ist für die L-Malatvergärung mit *Lactobacillus plantarum* zu erwarten und bei der Vergärung von L-Malat-4- ^{14}C sollten sich 100 % der eingesetzten Aktivität in der als CO_2 abgespaltenen Carboxylgruppe befinden. Tab.10 gibt die Gärbilanzen für käufliches L-Malat-U- ^{14}C und L-Malat-4- ^{14}C (Amersham) wieder.

Während die Vergärungen von L-Malat-U- ^{14}C in Puffer das erwartete Aktivitätsverteilungsmuster liefern, erhält man bei der Vergärung von papierchromatographisch vorgereinigtem L-Malat-4- ^{14}C nicht das erwartete Ergebnis. Statt 100 % der eingesetzten ^{14}C -Aktivität im CO_2 erhält man nur 60-70 %. Auf diese falsche Markierung des käuflichen L-Malat-4- ^{14}C weisen bereits Hatch (1972) sowie Sutton und Osmond (1972) hin. Die noch fehlenden 30-40 % wurden in L-Lactat, das durch Ätherextraktion aus dem Gäransatz isoliert wurde, gefunden. Um zu bestimmen, in welcher Position des Lactats sich die Fehlmarkierung befindet, wurde das Lactat zu Acetat und CO_2 abgebaut.

Tab.10: Vergärung von L-Malat-U-¹⁴C und L-Malat-4-¹⁴C durch *Lactobacillus plantarum* 14917 und *Lactobacillus plantarum*, ssp. *arabinosus* 8014.

Organismus	Substrat		Ein- satz Ipm	Bak- terien mg	CO ₂		Lactat		Ausbeute	
	L-Malat	μmol			Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%
L.pl.ara.	-U- ¹⁴ C	30	774945	0	179644	26	510435	74	690079	89
L.pl.14917	-U- ¹⁴ C	30	774945	0	171958	24,2	538891	75,8	710849	91,7
L.pl.ara.	-U- ¹⁴ C	40	776837	50	161930	23,8	516887	76,2	678817	87,4
L.pl.ara.	-U- ¹⁴ C	40	776837	10	218897	29,5	523833	70,5	742730	95,6
L.pl.ara.	-U- ¹⁴ C	40	776837	5	201419	26,5	557341	73,5	758760	97,7
L.pl.ara.	-4- ¹⁴ C*	80	473424	45	287900	60,7	186719	39,3	474619	100,5
L.pl.14917	-4- ¹⁴ C*	80	473424	45	299907	64,9	162292	35,1	462199	97,6
L.pl.14917	-U- ¹⁴ C+	40	40584	40	9143	22,5	31441	77,5		

* = Malat-4-¹⁴C von Amersham nach chromatographischer Reinigung in Phenol/Eisessig/Wasser/EDTA.

+ = Malatprobe von Osmond.

Tab.11: Abbau des Lactats aus der L-Malat-4- ^{14}C -Vergärung.

Lactat-einsatz Ipm	Acetat		CO_2	
	Ipm	%	Ipm	%
185251	3855	2	181396	98

Dabei zeigte sich (Tab.11), daß sich die Markierung nahezu ausschließlich in der Carboxylgruppe des Lactats befindet. Demnach ist L-Malat-4- ^{14}C der Firma Amersham zu 60-70 % in C-4 und zu 30-40 % in C-1 markiert.

Nachdem bei unseren Versuchen der Abbau von Malat-U- ^{14}C in Gegensatz zu den Versuchen von Sutton und Osmond (1972) die theoretisch erwarteten Werte ergibt, wurde noch ein direkter Vergleich der Abbaumethoden mit den von Osmond verwendeten Proben angestrebt. Dank des Entgegenkommens von Herrn Dr. Osmond erhielten wir von ihm Malatproben von Bryophyllum daigremontiana, die nach 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Licht, 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung + 300 sec. $^{12}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht und 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Dunkeln isoliert worden waren.

Tabelle 12 zeigt den Vergleich der von Osmond durch enzymatischen Abbau und von uns durch Vergärung mit Lactobacillus plantarum erhaltenen Werte.

Eine gute Übereinstimmung ergibt sich für die Proben nach 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung + 300 sec. $^{12}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht. Die Markierung befindet sich, wie auch Sutton und Osmond (1972) gefunden haben zu 50 % im C-1 und zu 50 % im C-4 des Malats.

Für die nach 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Licht und nach 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Dunkeln isolierten Proben weichen unsere Werte erheblich von den von Sutton und Osmond (1972)

Tab.12: Decarboxylierung von Malat aus Bryophyllum daigremontiana nach $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung durch *Lactobacillus plantarum* 14917 und *Lactobacillus plantarum*, ssp. *arabinosus* 8014. (Malatproben von Dr. Osmond).

Sample-Nr.	Organismus	Einsatz Ipm	CO_2		CO_2 (Osmond) % vom Einsatz	Lactat		Gesamt-Ausbeute	
			Ipm	% vom Einsatz		Ipm	% vom Einsatz	Ipm	% vom Einsatz
3	L.pl.14917	13965	8738	64,7	76-77	4591	35,3	13509	97,0
4	L.pl.ara.	14661	9131	64,1	76-77	5114	35,9	14245	97,3
5	L.pl.14917	14448	6505	50,4	50-51	6395	49,6	12900	89,4
6	L.pl.ara.	24216	10942	46,2	50-51	12436	53,8	23675	98,0
7	L.pl.14917	4479	3013	67,3	89-92	1461	32,7	4474	99,8
8	L.pl.ara.	5577	3580	67,0	89-91	1764	33,0	5344	96,0

Probe 3,4 = 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht
 Probe 5,6 = 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung + 300 sec. $^{12}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht
 Probe 7,8 = 15 sec. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Dunkeln

gefundenen Werten zu Ungunsten einer Markierung in C-4 des Malats ab. Diese Unterschiede sind schwer erklärbar.

Da sich bei unseren Malatabbauten mit *Lactobacillus plantarum* sowohl bei der quantitativen Bestimmung der Gärprodukte, als auch bei der Isotopenverteilung sehr gute Bilanzen mit wenigen Prozent Abweichungen von den theoretischen Werten ergeben haben, nehmen wir an, daß die von uns erhaltenen Werte die richtige Verteilung wiedergeben.

I.c.2. Die Markierungsverteilung in Malat aus Blattextrakten von CAM-Pflanzen nach Dunkelfixierung von $^{14}\text{CO}_2$.

Die ersten Untersuchungen von Bradbeer und Stiller (1958) und Jolchine (1959) über die Verteilung der Markierung in Malat, das nach $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung aus *Bryophyllum tubiflorum* isoliert worden war, ergaben, daß sich unabhängig von der Fixierungszeit 1/3 der eingebauten Aktivität in C-1 und 2/3 in C-4 befand.

Dagegen fanden Sutton und Osmond (1972) bei den kürzesten Fixierungszeiten (5, 10 sec.) nahezu 100 % der in Malat eingebauten Aktivität in der C-4-Position.

Die Untersuchung der Kinetik der Markierungsverteilung während der CO_2 -Dunkelfixierung der CAM-Pflanzen ist von theoretisch großer Bedeutung für die Klärung des Mechanismus der CO_2 -Dunkelfixierung.

Wir haben daher das Malat aus zwei Fixierungsversuchen, die Herr Dr. Kluge, TU München, durchführte, abgebaut. Verwendet wurden dazu Blätter von *Bryophyllum tubiflorum*, die sich in der Phase maximaler Malatbildung befanden. Nach verschiedenen Zeiten der $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung waren die Blätter extrahiert worden. Aus den von Herrn Dr. Kluge

an uns übergebenen Extrakten wurde das Malat papierchromatographisch isoliert und anschließend mit *Lactobacillus plantarum* abgebaut.

Wie die Tabellen 13 und 14 zeigen, enthält das Malat in allen Fällen rund 25 % der Aktivität in C-1 und 75 % in C-4. Eine Abhängigkeit von der Zeit läßt sich bei einer Fixierungsdauer bis zu maximal 5 Minuten nicht feststellen. Die auftretenden Unterschiede sind vermutlich auf die Variabilität innerhalb der verwendeten Blattstückchen einerseits und der Fehlerbreite der Abbaumethode andererseits zurückzuführen.

Diese Befunde stimmen mit denen der oben zitierten früheren Autoren überein, widersprechen aber denen von Sutton und Osmond (1972). Es ist anzunehmen, daß bei der von Osmond benützten enzymatischen Methode ein Fehler in Richtung auf zu hohe Werte für die Markierung in C-4 entsteht. Die Methode sollte durch Bilanzversuche, wie sie für den Abbau durch *Lactobacillus plantarum* gemacht wurden, überprüft werden.

Tab.13: $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung durch Bryophyllum tubiflorum - Abbau des gebildeten Malats durch Lactobacillus plantarum 14917 und Lactobacillus plantarum, ssp. arabinosus 8014 (Zeitkurve I von Dr. Kluge)

Fix.- Zeit sec.	CO_2		Lactat		Zell- susp. Ipm	Ein- satz Ipm	Ausbeute		Organismus
	Ipm	%	Ipm	%			Ipm	%	
40	24008	66,2	12095	33,4	151	41425	36254	87,5	L.pl.ara.
60	20665	65,6	10594	33,6	243	31550	31502	99,8	L.pl.ara.
120	69118	61,1	33405	29,5	527	134511	113055	84,0	L.pl.ara.
180	92221	67,0	45036	33,0	306	160372	137563	86,0	L.pl.ara.
20	4879	74,6	1527	25,4	141	6880	6547	95,5	L.pl.14917
40	28691	72,4	10947	27,6	121	41425	39759	96,0	L.pl.14917
60	20051	76,0	6212	24,0	---	28396	26263	92,5	L.pl.14917
120	77527	74,0	26825	25,6	438	117697	104790	89,0	L.pl.14917
180	75141	69,7	32199	30,3	348	140325	107688	77,0	L.pl.14917
40	10181	66,0	5168	34,0	119	15516	15468	99,7	L.pl.14917
60	5357	74,3	1790	25,7	---	7107	7147	100	L.pl.14917
120	25004	74,3	8286	25,7	352	32357	33615	103	L.pl.14917
180	30946	73,0	11076	27,0	404	43600	42428	97,4	L.pl.14917

Tab. 14: $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung durch Bryophyllum tubiflorum : Abbau des Malats aus
Blattextrakten durch Lactobacillus plantarum 14917 (Zeitkurve II von Dr.Kluge)

Fixie- rungs- zeit	CO_2		Lactat		Einsatz Ipm	Ausbeute		Organismus
	Ipm	%	Ipm	%		Ipm	%	
10 sec.	1060	75	358	25	1383	1418	102,5	L.plant.14917
20 sec.	2488	74	887	26	3326	3375	101,5	"
30 sec.	3915	65,8	2043	34,2	6133	5958	97,4	"
40 sec.	12586	73,0	4601	27,0	18244	17187	94,5	"
60 sec.	16776	75,0	2683	25,0	22262	22242	100	"
180 sec.	18011	80,5	4436	19,5	22856	22447	98,7	"
300 sec.	75645	72,7	29074	27,3	113119	104719	92,0	"

II. Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gärprodukte und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" bei Leuconostoc-stämmen.

Johnson und Mc.Cleskey (1957, 1958) bemerkten bei ihren Experimenten mit Stämmen von *Leuconostoc mesenteroides*, daß ruhende Zellsuspensionen anderer Stämme als *Leuconostoc mesenteroides* 39 bei Vergärungen von Glucose sehr wohl Sauerstoff verbrauchten. Dieses unterschiedliche Verhalten im Vergleich zu *Leuconostoc mesenteroides* 39 (De Moss und Gibbs, 1955) veranlaßte die Autoren, den aeroben Abbau von Kohlehydraten näher zu untersuchen. Dabei stellten sie fest, daß die untersuchten Stämme in Anwesenheit von Luft befähigt waren, Sauerstoff als Elektronenacceptor zu benutzen und dabei Acetat statt Äthanol zu produzieren.

Wie schon in Kapitel I erwähnt, kann durch Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" ("molar growth yield") die ATP-Produktion bei der Vergärung eines Substrates bestimmt werden und damit lassen sich Rückschlüsse auf den Stoffwechselweg ziehen. Die Energiebilanz mit *Leuconostoc mesenteroides* wurde schon von De Moss et al. (1951) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß unter anaeroben Bedingungen nur 1 Mol ATP pro Mol verbrauchter Glucose gewonnen wird.

Unter aeroben Bedingungen wird bei allen Stämmen von *Leuconostoc mesenteroides* außer bei Stamm 39 (De Moss) Acetylphosphat zu Acetat und ATP gespalten, so daß die aerobe Energiebilanz der Glucosevergärung einen Nettogewinn von insgesamt 2 Mol ATP ergibt. Es wird für diesen Fall zu erwarten sein, daß die Y_{Glucose} -Werte zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen einen Unterschied um den Faktor 2 ergeben.

II.1. Der Vergleich der bei aeroben und anaeroben Wachstum gebildeten Gärprodukte.

Die eigenen Untersuchungen verschiedener *Leuconostoc*-Stämme auf Acetatbildung bei aeroben und anaeroben Wachstum ergaben die in Tabelle 15 zusammengestellten Werte. Unter anaeroben Bedingungen wurde von allen *Leuconostoc*-Stämmen nur wenig Acetat gebildet und es lief wohl eine normale heterofermentative Milchsäuregärung ab, wobei als C-2-Bruchstück hauptsächlich Äthanol entstand.

Aerob hingegen entstand außer bei *Leuconostoc mesenteroides* De Moss 39 (= ATCC 12291), der auch unter diesen Bedingungen nur wenig Acetat bildet, bei allen anderen Stämmen Acetat statt Äthanol, meist äquimolar zur gebildeten Milchsäure. Eine Ausnahme bildete der Stamm *Leuconostoc paramesenteroides* 883, der erheblich mehr Acetat als Lactat produzierte. Dieses besondere Verhalten wird später noch näher beschrieben.

II.2. Die Energiebilanz bei *Leuconostoc* nach aeroben und anaeroben Wachstum.

Der Einfluß einer Änderung der Endprodukte bei Vergärung von Glucose durch *Leuconostoc* auf die Energieausbeute ist bisher nicht untersucht worden. Um dies zu prüfen, bietet sich an, den "molaren ökonomischen Koeffizienten" zu bestimmen, der ja, wenn die Bildung von Acetat mit einem Energiegewinn verbunden ist, unter aeroben Bedingungen erhöht sein muß. Verwendet wurden dazu folgende Stämme :

1. *Leuconostoc paramesenteroides* 883: bildet aerob mehr Acetat, als auf Grund der anaeroben Äthanolbildung zu erwarten wäre.
2. *Leuconostoc mesenteroides* 14430: bildet aerob statt Äthanol quantitativ Acetat.
3. *Leuconostoc mesenteroides* 12291 (De Moss 39): bildet auch aerob kein Acetat.

Tab.15: Die Bildung von Acetat bei Stämmen von *Leuconostoc* bei Wachstum in MRS.

Anzahl: a. aerob : 10 ml MRS (ohne Citrat und Acetat) in 100 ml Kolbenchen auf der Schüttelmachine bei 30°C.
 b. anaerob: 10 ml MRS (ohne Citrat und Acetat) in Reagenzgläsern im Brutschrank bei 30°C (microaerophil).

Species	Stammnummer	aerob		anaerob	
		Acetat μmol/ml	D-Lactat μmol/ml	Acetat μmol/ml	D-Lactat μmol/ml
Lc.mesenteroides	12291 ATCC (39 De Moss)	9,4	50,0	0,96	42,3
Lc.mesenteroides	"	9,63	58,4	1,7	59,5
Lc.mesenteroides	14430 ATCC	38,9	38,6	6,77	42,9
"	"	43,6	37,3	7,68	62,17
Lc.mesenteroides	10878 ATCC	37,6	40,8	6,0	43,55
Lc.mesenteroides	10830 ATCC	40,8	40,8	5,81	40,03
Lc.mesenteroides	9135 ATCC	43,7	42,9	5,64	42,31
Lc.mesenteroides	538 NCDO	30,3	40,8	5,32	41,50
Lc.mesenteroides	523 NCDO	29,0	27,2	7,10	39,4
Lc.mesenteroides	183 NCDO	28,9	31,12	0,8	32,6
Lc.mesenteroides	13146 ATCC	15,3	42,1	6,45	39,4
Lc.dextranicum	517 NCDO	25,5	42,3	0	28,0
Lc.lactis	ZgV ₁ NIZO	14,7	31,7	0,00	33,4
	"	21,3	37,1	0,61	46,8
Lc.paramesenteroides	883 NCDO	23,2	10,2	1,6	35,3
	"	24,14	7,7	1,46	49,54
Lc.spec.	G	32,2	35	3,38	42,9

Wie die Tabelle 16 zeigt, ergibt sich bei *Leuconostoc mesenteroides* 12291 für aerobe und anaerobe Bedingungen dieselbe Zellausbeute, nämlich $Y_{\text{Glucose}} = 10 \text{ mg/mmol}$. *Leuconostoc mesenteroides* 14430, der unter aeroben Bedingungen statt Alkohol quantitativ Acetat bildet, liefert dagegen aerob einen Y_{Glucose} -Wert von 20 mg/mmol , also den doppelten Wert wie unter anaeroben Bedingungen. Dies entspricht der Annahme, daß dieser Stamm in der Lage ist, durch Freisetzung von Acetat aus Acetylphosphat mit Hilfe von Acetatskinase (ATP : Acetatphosphotransferase, E.C.2.7.2.1.) ein weiteres Mol ATP pro Mol abgebauter Glucose zu produzieren.

Der Stamm *Leuconostoc paramesenteroides* 883, der aerob sehr viel mehr Acetat produziert, ergibt bei aerober Kultur einen Y_{Glucose} -Wert von rund 30 mg/mmol , also das Dreifache des bei anderen Stämmen unter anaeroben Bedingungen gefundenen Wertes. Dies spricht für eine Netto-ATP-Ausbeute von 3 Mol pro Mol verbrauchter Glucose. Bei Stamm-Nr. 883 liegt allerdings auch der Wert für die anaerobe Bedingung höher als bei den übrigen Stämmen, nämlich bei $Y_{\text{Glucose}} = 14 \text{ mg/mmol}$. Wenn man die Bildung von 10.5 g Zelltrockenmasse pro 1 Mol ATP in Rechnung stellt, so ist dieser erhöhte Wert verständlich, wenn nicht nur das aus der Pentose-Phospho-Ketolase-Spaltung stammende Acetylphosphat mit ATP-Gewinn zu freiem Acetat gespalten wird, sondern auch das aus der phosphoroklastischen Spaltung von Pyruvat stammende, worauf weiter unten noch näher eingegangen wird.

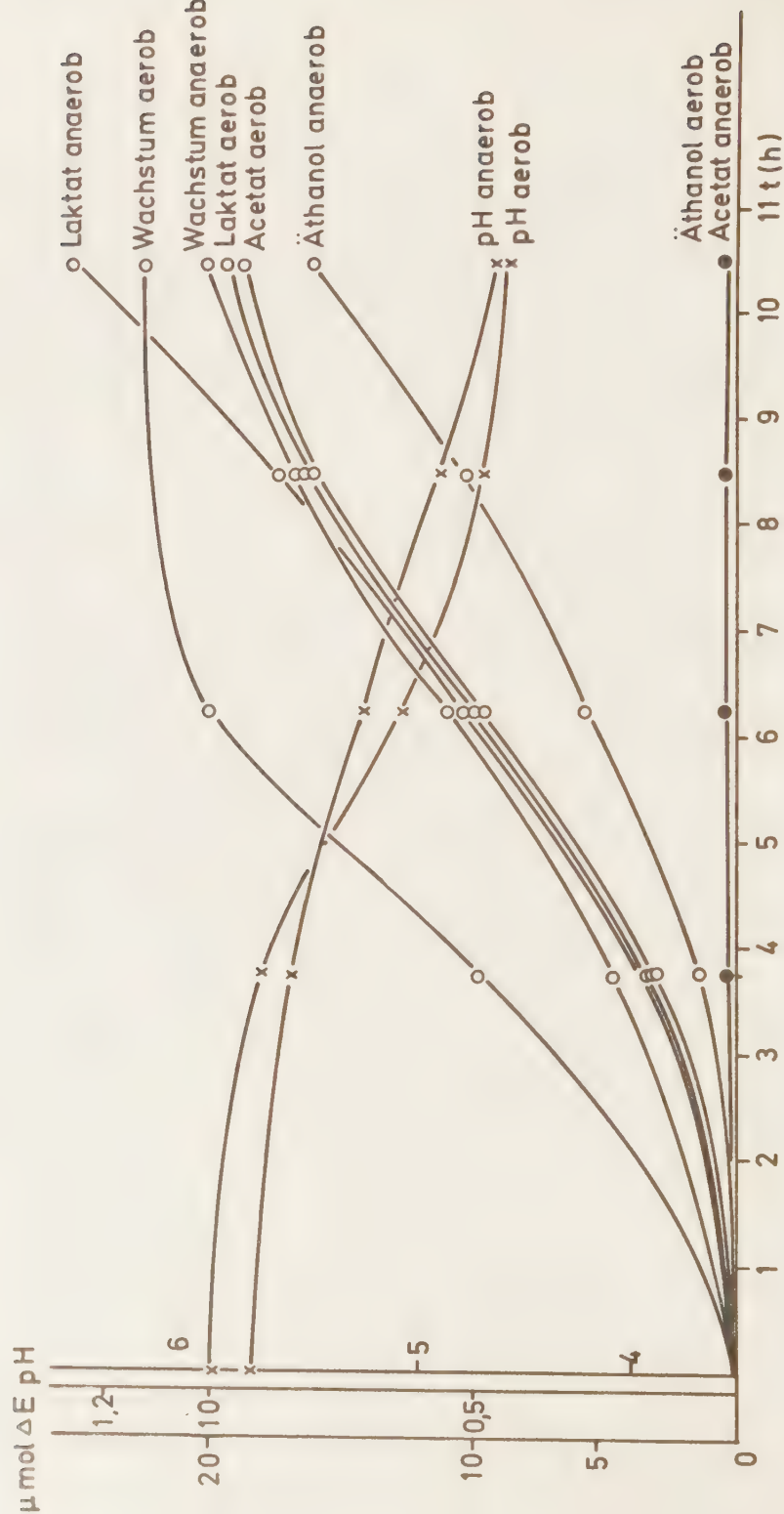
Tab.16: "Molar Growth-Yield"-Bestimmung verschiedener Leuconostocstämme bei Wachstum in MRS mit Glucose als Substrat.

Untergattung	Stamm	Y _{Glucose} (mg/mmol) aerob			Y _{Glucose} (mg/mmol) anaerob			Wachstums- zeit
		0,2 % Gluc.	0,3 % Gluc.	0,4 % Gluc.	0,2 % Gluc.	0,3 % Gluc.	0,4 % Gluc.	
Leuconostoc paramesenteroides	883	31,2	0	29,6	14,1	0	14,3	18 h
	"	32,6	0	28,4	14,0	0	14,35	24 h
Leuconostoc mesenteroides	12291	9,5	9,0	10,3	8,5	10,5	9,1	25 h
	"	10,5	10,8	11,1	9,6	9,4	8,8	29 h
Leuconostoc mesenteroides	14430	24,5	21,2	25,3	11,7	10,3	12,4	25 h
	"	22,9	20,5	21,2	12,0	9,9	11,8	32 h

II.3. Wachstum, pH-Änderung und Gärprodukte von *Leuconostoc paramesenteroides* 883 in aerober und anaerober Kultur.

Leuconostoc paramesenteroides 883 wurde anaerob unter Stickstoff und aerob auf der Schüttelmaschine in MRS ohne Citrat und Acetat angezogen. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen, das Wachstum durch Trübungsmessung und die Gärprodukte durch enzymatische Analyse bestimmt. In der Abb.4 sind die Wachstumskurve und die Zunahme der Gärprodukte graphisch dargestellt.

Nach einer Anlaufphase von 2-3 Stunden ist das Wachstum bis zu einer Extinktionsdifferenz von 1,0 linear. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist aerob genau doppelt so groß wie anaerob. Da aber die im Photometer bei 578 nm gemessene Trübung der gebildeten Zellmasse direkt proportional ist (Stouthamer, 1969) bedeutet das, daß unter aeroben Bedingungen auch die doppelte Zellmasse wie unter anaeroben Kulturbedingungen gebildet wird. Dies stimmt auch mit den im vorhergehenden Abschnitt gefundenen Y_{Glucose} -Werten überein. Diese Verdoppelung des Wachstums im Bereich der log-Phase geht, wie die entsprechenden Kurven für die Gärproduktbildung zeigen, nicht auf einen Unterschied in der Gärgeschwindigkeit zurück, sondern auf die Bildung von Acetat statt Äthanol, wobei zusätzlich ein Mol ATP freigesetzt wird. Aus der Acetatmenge ergibt sich, daß weniger als 3 % des Pyruvats decarboxyliert werden. Dieser Befund steht an sich im Gegensatz zu den relativ hohen Werten für $Y_{\text{Glucose}} = 14 \text{ mg/mmol}$ unter anaeroben Bedingungen und $Y_{\text{Glucose}} = 30 \text{ mg/mmol}$ unter aeroben Bedingungen.



II.4. Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gärbilanz für Glucose bei *Leuconostoc paramesenteroides* 883.

Um die Hypothese, daß *Leuconostoc paramesenteroides* 883 in erheblichem Umfang Pyruvat phosphoroklastisch spaltet, zu festigen, wurde die Gärbilanz für Glucose näher untersucht. Die Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Gärprodukte nach aerober und anaerober Vergärung von Glucose in Phosphatpuffer.

Tab.17: Quantitative Bestimmung der Gärprodukte nach aerober und anaerober Vergärung von Glucose durch *Leuconostoc paramesenteroides* 883.

Glucose μmol	Gärbedingung	CO ₂ - Prod. μmol	O ₂ - Verbr. μmol	Acetat μmol	EtOH μmol	Lactat μmol
80	anaerob	79,3	0,00	0,00	78,0	79,5
80	aerob	127	120	112	0,00	36,0
80	aerob	125	127	124	0,00	41,7

Unter anaeroben Bedingungen läuft eine normale heterofermentative Milchsäuregärung ab. Pro Mol Glucose entstehen CO₂, Äthanol und Lactat im Molverhältnis von 1 : 1 : 1.

Bei der aeroben Vergärung entsteht Acetat statt Äthanol, das Molverhältnis CO₂ : Acetat : Lactat betrug hier aber überraschenderweise 3 : 3 : 1. Gleichzeitig kann hier ein zur CO₂-Produktion äquimolarer Sauerstoffverbrauch gemessen werden.

Diese Beobachtung setzt einen zusätzlichen Mechanismus der Acetatbildung voraus, wobei in erster Linie an die phosphoroklastische Spaltung von Pyruvat zu denken ist. Der folgende Reaktionsablauf (I, II) ist mit der Gärbilanz im Einklang:

I. 2 Mol Glucose $\longrightarrow$ 2 Mol CO_2 + 2 Mol Acetat + 2 Mol Pyruvat - 3 O_2

II. 2 Mol Pyruvat $\longrightarrow$ 1 Mol CO_2 + 1 Mol Acetat + 1 Mol Lactat

(A) 2 Mol Glucose $\longrightarrow$ 3 Mol CO_2 + 3 Mol Acetat + 1 Mol Lactat - 3 O_2

Um diesen Mechanismus eindeutig nachzuweisen, wurde die Vergärung von positionsmarkierten Glucosen in Phosphatpuffer durchgeführt. In der Tabelle 18 sind die Werte für aerobe und anaerobe Gäransätze zusammengestellt.

Bei der anaeroben Vergärung wird aus Glucose-6- ^{14}C erwartungsgemäß praktisch nur markiertes Lactat gebildet.

Auch die Verteilung der ^{14}C -Aktivität in den Gärprodukten aus Glucose-3,4- ^{14}C entspricht der Erwartung, daß etwa gleiche Teile der Markierung in Acetat + Äthylalkohol und in Lactat auftreten.

Bei der aeroben Vergärung ergeben Glucose-1- ^{14}C , Glucose-2- ^{14}C und Glucose-3- ^{14}C das erwartete Ergebnis, nämlich Lokalisierung der ^{14}C -Aktivität ausschließlich im CO_2 (Glucose-1- ^{14}C) bzw. im Acetat + Äthanol (Glucose-2- ^{14}C , Glucose-3- ^{14}C).

Die in den Gleichungen I und II wiedergegebenen Reaktionsfolgen werden durch die Verteilung der ^{14}C -Aktivität nach Vergärung von Glucose-3,4- ^{14}C und Glucose-6- ^{14}C bewiesen.

Im Falle der Glucose-3,4- ^{14}C muß man annehmen, daß wie bei Glucose-3- ^{14}C die Markierung aus C_3 ausschließlich im Äthanol + Acetat auftritt. Setzt man die restlichen 50 % der Markierung aus C_4 gleich 100 %, so finden sich nur 76 % davon im Lactat, 12 % sind im CO_2 und 12 % in Formiat. Insgesamt sind also 24 % des ^{14}C aus C_4 der Glucose in C-1-Körper eingegangen. Pyruvat ist also zu 25 % decarboxyliert und zu 75 % zu Milchsäure reduziert worden.

Tab.18: Anaerobe und aerobe Glucosevergärung durch Leuconostoc paramesenteroides 883.

Substrat	Gär- bedin- gung	CO ₂		Acetat		EtOH		Lactat		Zellsusp.		Ein- satz Ipm	Ausbeute	
		Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%		Ipm	%
Glu-6- ¹⁴ C	anaerob	21937	3,3	7702	1,2	5365	0,8	612243	93,1	10947	1,7	674275	658194	97,5
Glu-3,4- ¹⁴ C	anaerob	2623	0,3	54720	8,2	302395	45,4	296649	44,5	9863	1,5	685520	666250	97,2
Glu-1- ¹⁴ C	aerob	1151468	98,8	10172	0,87	678	0,36	3486	0,3	5745	0,5	1169993	1171549	100,9
Glu-2- ¹⁴ C	aerob	351	0,06	527234	93,8	22802	4,06	1462	0,3	10000	1,8	567257	561850	99,0
Glu-3- ¹⁴ C	aerob	4540	0,5	867870	95,8	23020	2,5	---	0,0	10900	1,2	943360	906330	96,1
Glu-3,4- ¹⁴ C	aerob	64846	6,44	465778	46,3	28353	2,8	381325	37,9	12383	1,2	977672	1018289	104
		65604*	6,5											
Glu-6- ¹⁴ C	aerob	22859	1,74	289202	22,0	12204	0,9	988479	75,3	15000	1,1	1286742	1327735	103,2

* = Formiat

Dementsprechend sollten beim Einsatz von Glucose-6-¹⁴C 25 % der Markierung im Acetat + Äthanol (C₅-C₆) wiedergefunden werden. Tatsächlich waren 22.9 % der ¹⁴C-Aktivität in den C-2-Körpern und 75 % im Lactat fixiert.

Einige vorläufige Versuche lassen vermuten, daß der Prozentsatz der Pyruvatdecarboxylierung von der Vergärungszeit abhängig ist. So wurde in einem Versuch mit Glucose-6-¹⁴C, bei dem die Inkubationszeit über die Beendigung der Vergärung hinaus für längere Zeit fortgesetzt worden war, nur 15 % der eingesetzten Aktivität im Lactat und 85 % in C-2-Verbindungen gefunden. Es ist anzunehmen, daß dieser Stamm das während des Wachstums gebildete Lactat wieder zu Pyruvat zu oxidieren und dieses wieder zu Acetat und CO₂ zu spalten vermag.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei *Leuconostoc paramesenteroides* 883 C₁, C₂ und C₃ der Glucose bei aerober Vergärung in die erwarteten Gärprodukte CO₂ und Acetat + Äthanol eingehen, C₄ - C₆ aber je nach Versuchsdauer mehr oder weniger vollständig zu CO₂ bzw. Formiat (C₄) und Acetat (C₅-C₆) decarboxyliert wird. Dies erklärt die verhältnismäßig hohe Acetatmenge im Vergleich zur Milchsäure und dementsprechend auch die hohen Y_{Glucose}-Werte.

II.5. Die Verbreitung des Pyruvatabbaues bei verschiedenen Stämmen von *Leuconostoc*.

Um einen Überblick zu erhalten, wie weit in der Gattung *Leuconostoc* der Abbau von Pyruvat verbreitet ist, wurde mit verschiedenen Stämmen von *Leuconostoc* Glucose-6-¹⁴C vergoren. Wie aus der Tabelle 19 hervorgeht, stellt *Leuconostoc paramesenteroides* 883 einen Extremfall dar, aber auch alle anderen untersuchten Stämme können in erheblichem Umfang markiertes Acetat aus Glucose-6-¹⁴C bilden. Der weitere Abbau des Pyruvats ist also in der Gattung *Leuconostoc* weit verbreitet. Nur *Leuconostoc*

Tab.19:Aerobe Vergärung von Glucose-6-¹⁴C durch verschiedene Leuconostocstämme.

Stamm-Nr.	Einsatz Ipm	CO ₂		Acetat		EtOH		Lactat		Bakt.-Susp.		Restglucose		Gesamtausbeute	
		Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%
523	696579	1465	0,26	133130	23,5	3700	0,65	412519	72,5	17206	3,0	0	0	0	0
517	696579	9192	1,3	114198	16,4	5955	0,8	524304	75,0	41239	5,9	0,0	0,0	695888	100
538	696579	733	0,13	296219	54,2	2800	0,5	237231	43,3	9819	1,8	100180	14,4	647182	93,0
ZgV ₁	696579	830	0,15	265490	49,6	11985	2,2	247565	46,0	9151	1,7	0	0	0	0
14430	696579	28525	4,50	58300	9,3	3528	0,56	520099	82,6	19385	3,1	0	0	0	0
883	696579	15852	2,40	522375	79,5	5553	0,80	88495	13,5	24727	3,8	48720	7,4	705722	101

mesenteroides 39, der ursprünglich zur Aufklärung des Mechanismus der heterofermentativen Milchsäuregärung verwendet worden war, zeichnet sich durch sein fast vollständiges Unvermögen zur Pyruvatspaltung aus.

II.6. Die aerobe und die anaerobe Vergärung von Pyruvat und Formiat durch *Leuconostoc paramesenteroides* 883.

Da der Abbau von Pyruvat, das bei der Glycolyse entsteht, in der Gattung *Leuconostoc* weit verbreitet ist, wie anhand der Vergärung von Glucose-6- ^{14}C bereits gezeigt wurde, schien es angebracht, zu untersuchen, ob auch zugesetztes Pyruvat entsprechend abgebaut wird.

Die Tabelle 20 zeigt die Bilanz für aerobe und anaerobe Vergärungen von markiertem Pyruvat. Wie man sieht, werden von 80 μmol Pyruvat in 10 Stunden nur etwa 30-40 % vergoren. Bei der anaeroben Vergärung von Pyruvat-U- ^{14}C verhält sich die Markierung im Acetat zu der im Formiat wie 2 : 1, d.h. die beiden Produkte entstehen in äquimolaren Mengen.

Die entsprechende Vergärung von Pyruvat-l- ^{14}C liefert 92 % der eingesetzten Aktivität im Formiat (90 %) und CO_2 (2 %), C-2-Körper sind immerhin zu 8 % markiert (Äthanol : 5,3 %; Acetat: 2,6 %).

Eine Erklärung für diese relativ starke "Verschmierung" der Aktivität kann nicht gegeben werden.

Bei der Vergärung von uniform markiertem Pyruvat unter aeroben Bedingungen sind während der Versuchsdauer 43 % des eingesetzten Substrates umgesetzt worden. Die Aktivität war auf CO_2 (7 %), Formiat (32,3 %), Äthanol (11,1 %) und Acetat (49,5 %) verteilt. Das Verhältnis der Markierung in C-1-Körpern zu der in C-2-Körpern beträgt annähernd 1 : 2, d.h. es werden C-1- und C-2-Körper in äquimolaren Mengen gebildet.

Tab.20: Aerobe und anaerobe Vergärung von Pyruvat-U- ^{14}C , Pyruvat-l- ^{14}C und Formiat- ^{14}C durch *Leuconostoc paramesenteroides* 883.

Substrat	Ein- satz Ipm	CO ₂		EtOH		Acetat+Form.		Acetat		Formiat		Restpyruvat		Ausbeute			
		Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%		
Pyruvat-U- ¹⁴ C	a	809363	3965	1,2	2,9	9241	2,9	303324	95,8	193584	61,1	109735	34,6	500710	61,3	817240	101
	a	1130661	6510	1,8	5,3	18913	5,3	330470	92,8	9359	2,6	321111	90,2	677810	65,6	1033703	91,4
Pyruvat-U- ¹⁴ C	b	809363	23206	7,0	36672	11,1	270526	81,9	163615	49,5	106910	32,3	439487	57,1	769891	95,1	
	b	1130661	57217	18,7	3959	1,3	244720	80	11150	3,6	233568	76,3	725787	70,3	1031683	91,2	
Formiat- ¹⁴ C	a	2579595	11947	0,5	1779	0,07	2548024	99,5	10647	0,4	2546377	99,1	---	---	2561750	99,3	
	b	2579595	18446	0,7	---	0,00	250851	99,3	5954	0,2	2502897	99,1	---	---	2527297	97,6	

* = bezogen auf vergorenes Substrat

a = anaerob

b = aerob

Der Parallelversuch mit Pyruvat-1-¹⁴C lieferte 18,7 % der Aktivität im CO₂, 76,3 % im Formiat, 1,3 % im Äthanol und 3,6 % im Acetat. Während bei der Vergärung von Pyruvat unter anaeroben Bedingungen als C-1-Körper nahezu ausschließlich Formiat entsteht - nur 1-2 % der Aktivität befindet sich im CO₂ -, finden sich bei der aeroben Vergärung von Pyruvat-1-¹⁴C immerhin fast 20 % der ¹⁴C-Aktivität im CO₂. Der bei der Freisetzung von CO₂ aus Formiat entstehende Wasserstoff wird wahrscheinlich durch Flavinenzyme auf den Sauerstoff der Luft übertragen.

Da bei der Decarboxylation von Pyruvat unter aeroben Bedingungen als C-1-Körper nicht ausschließlich Formiat, sondern auch CO₂ entsteht, sollte beim Einsatz von Formiat aerob eine CO₂-Entwicklung zu beobachten sein. Wider Erwarten ist dies jedoch nicht der Fall, wie die Tabelle 22 zeigt. Aus Formiat wird unter aeroben und aneroben Bedingungen weniger als 1 Prozent der ¹⁴C-Aktivität in CO₂ gefunden.

II.7. Zellausbeute und ATP-Produktion bei *Leuconostoc mesenteroides* 12291 bei Hemmung der Triosephosphat-Dehydrogenase.

Beim Stamm *Leuconostoc mesenteroides* 12291 (De Moss 39), der sich durch sein Unvermögen zur Pyruvatspaltung auszeichnet, muß durch Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase mit Monojodacetat eine vollständige Hemmung des Wachstums zu erzielen sein, wenn er nicht in der Lage ist, auf einem anderen Weg einen ATP-Gewinn zu erzielen. Theoretisch denkbar wäre die Induktion einer Glycerin/Mannit-Gärung, wobei statt Äthanol Acetat liegen bleibt.

Um zu prüfen, ob *Leuconostoc mesenteroides* 12291 dazu in der Lage ist, wurde er in MRS-Lösung mit unterschiedlicher Jodacetatkonzentration inkubiert (siehe Tabelle 21) und anaerob bebrütet.

Tab. 21: Wachstum, Lactat- und Acetatbildung von Leuconostoc mesenteroides 12291 in MRS + Jodacetat. (Äthanol nicht bestimmt)

Hemm-Konzentr. molar	Wachstums-zeit	Wachstums- -dichte ΔE_{578}	D-Lactat $\mu\text{mol/ml}$	L-Lactat $\mu\text{mol/ml}$	Ges.- Lactat $\mu\text{mol/ml}$	Acetat $\mu\text{mol/ml}$	pH-Wert
0	24 h	0,764					
	30 h	0,746	27	0,0	27	1,53	
	60 h	0,752	27,4	0,0	27,4	1,53	4,86
10^{-5}	24 h	0,470					
	30 h	0,491	17,4	0,0	17,4	1,94	
	60 h	0,477	17,1	0,0	17,1	2,34	5,26
$3 \cdot 10^{-4}$	24 h	0,118					
	30 h	0,134	4,10	0,0	4,10	1,33	
	60 h	0,129	4,30	0,0	4,30	1,94	5,85

In der Tabelle 21 ist das Wachstum, die Lactat- und die Acetatbildung angegeben. Äthanol wurde nicht bestimmt. Wenn eine Glyceringärung stattfinden würde, dann müßte mit zunehmender Hemmkonzentration die Menge der Milchsäure abnehmen, die Acetatmenge ansteigen. Bei den drei verschiedenen Ansätzen ist zwar die Abnahme der Milchsäure festzustellen, die absolute Acetatmenge bleibt jedoch gleich.

Um zu bestimmen, ob durch die Zugabe des Hemmstoffes die Energiebilanz verändert wird, wurde der "ökonomische Koeffizient" für die Glucosevergärung in MRS-Nährlösung mit Hemmstoffzusatz bestimmt (siehe Tabelle 22).

Tab.22: "Molar growth yield"-Bestimmung von *Leuconostoc mesenteroides* 12291 mit Jodacetathemmung unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Hemmkonz. molar	Y _{Glucose} aerob		Y _{Glucose} anaerob	
	0,2 % Glucose mg/mmol	0,4 % Glucose mg/mmol	0,2 % Glucose mg/mmol	0,4 % Glucose mg/mmol
0,0	9,04	9,60	9,24	9,40
10 ⁻⁵	8,45	8,61	8,71	9,00
3 · 10 ⁻⁴	0,0	0,0	0,20	0,30

Die Y_{Glucose}-Werte nach 24 h Wachstumszeit mit 10⁻⁵ molarer Monojodacetathemmung entsprechen nahezu denen von Glucose ohne Hemmstoffzusatz. Bei einer Hemmkonzentration von 3 · 10⁻⁴ molar hört das Wachstum fast vollständig auf.

Die Werte des "molaren ökonomischen Koeffizienten" für 10⁻⁵ molare Hemmstoffkonzentration beruhen nicht auf einem Energiegewinn durch Acetatbildung, sondern auf dem Energiegewinn einer normalen, aber verlangsamten Glucosevergärung mit einer etwas verminderten Gärrate.

D. Diskussion

I. Der Malatabbau durch Leuconostoc und Lactobacillen

I.1. Der Einfluß des Malates auf die Glucosevergärung bei Leuconostoc.

Die von Doelle (1971) gefundene mehr als 50 %ige Beteiligung des Kohlenstoffgerüsts der Glucose an der Milchsäurebildung bei gleichzeitiger Vergärung von Malat steht im Gegensatz zu den von Gunsalus und Gibbs (1952) erarbeiteten Mechanismus der heterofermentierenden Milchsäuregärung dieser Organismen und könnte nur durch eine bisher unbekannte Variation des Abbaufweges ermöglicht werden.

Bei eigenen Gärversuchen mit *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291, einem Stamm, der mit dem von Doelle (1971) verwendeten *Leuconostoc mesenteroides* 39 identisch ist, konnte jedoch

unter den von Doelle (1971) verwendeten Bedingungen keine derartige Verschiebung der Gärprodukte festgestellt werden. Die ^{14}C -Aktivität aus C_1 der Glucose wurde quantitativ im CO_2 , die Markierung aus C_2 und C_3 der Glucose in Äthanol (98 - 99 %) und Acetat (1 - 2 %) und die Markierung der Glucosekohlenstoffatome 4, 5 und 6 in der gebildeten Milchsäure wiedergefunden. Diese Verteilung entspricht genau dem Mechanismus der heterofermentierenden Milchsäuregärung, wie er von Gunsalus und Gibbs (1952) gefunden wurde. Demnach werden auch in Gegenwart von Malat nur 50 % des Kohlenstoffskeletts der Glucose, nämlich die untere Hälfte (C_4 - C_6) in Milchsäure verwandelt.

Wie die Gärversuche mit markiertem L-Malat mit und ohne gleichzeitiger Glucosevergärung in Puffer und in MRS-Medium während des Wachstums zeigen, wird L-Malat von *Leuconostoc mesenteroides* 12291 quantitativ zu CO_2 und L-Lactat abgebaut. Zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings ohne Verwendung markierten Malats, kamen auch schon Peynaud et al. (1968a, 1968b) und Schütz und Radler (1973). Die enzymatische Analyse der Gärprodukte ergibt, daß aus Glucose nur D-Lactat, aus L-Malat ausschließlich L-Lactat entsteht.

Alizade und Simon (1973) konnten durch Vergärung von Malat- $\text{U-}^{14}\text{C}$ und Malat- $2\text{-}^3\text{H}$ durch *Leuconostoc mesenteroides* 12291 zeigen, daß das Kohlenstoffgerüst des L-Malats auch bei gleichzeitiger Vergärung von Glucose quantitativ für die CO_2 - (C_4) und die L-Lactat-Bildung ($\text{C}_1\text{-C}_3$) aufgebraucht wird und kein Austausch zwischen Pyruvat aus der Glycolyse und Pyruvat aus dem Malatabbau erfolgt.

Bei gleichzeitiger Vergärung von Glucose wird aber ein Teil des Wasserstoffes aus Malat auf Pyruvat aus der Glycolyse übertragen. Diese Wasserstoffübertragung ist einer der Gründe dafür, daß Alizade und Simon (1973) eine direkte

Decarboxylierung von Malat zu CO_2 und Lactat, wie sie von Peynaud et al. (1968a, 1968b) vermutet worden war, ausschließen. Sie nehmen vielmehr an, daß die Reaktion durchaus eine Oxidation und eine Reduktion einschließt, dabei aber das intermediär entstehende Pyruvat am Enzym gebunden bleibt und daher nicht mit dem Pyruvat aus der Glycolyse austauschbar ist.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von uns gefundenen gut überein, widersprechen aber denen von Doelle (1971), insbesondere dessen Annahme, daß in Gegenwart von Malat eine L-LDH aktiviert würde und dabei auch L-Lactat aus der Glucose entstünde. Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, wird in Gegenwart von Malat nur dann eine größere Menge von Lactat aus Glucose als beim Wachstum ohne Malat gebildet, wenn Glucose im Überschuß vorhanden ist. Bei dem Mehrbetrag handelt es sich aber um D-Milchsäure, deren vermehrte Bildung aus Glucose nur deshalb möglich ist, weil durch den Abbau des Malats die Ansäuerung des Mediums vermindert wird und dadurch die Gärung länger fortgesetzt werden kann.

I.2. Die Stöchiometrie des Malatabbaues bei *Lactobacillus plantarum*.

Die, wie einleitend ausgeführt, durch die Untersuchungen von Sutton und Osmond (1972) aufgetretenen Zweifel über die Stöchiometrie des Malatabbaues durch *Lactobacillus plantarum* konnten in den oben berichteten Befunden nicht bestätigt werden.

Die Versuche zur Vergärung von L-Malat durch zwei Stämme von *Lactobacillus plantarum* in Puffer mit verschiedenem pH-Wert und mit unterschiedlicher Malatkonzentration haben für alle Bedingungen gezeigt, daß das eingesetzte L-Malat quantitativ zu CO_2 und DL-Lactat vergoren wird. Der nach der

enzymatischen Analyse der Gärprodukte bei allen Versuchen sichtbar werdende geringe Überschuß an Lactat im Vergleich zu CO_2 beruht wohl nicht auf einem methodischen Fehler, sondern geht auf die Bildung von Milchsäure aus endogenem Zellmaterial zurück. Dies zeigt sich deutlich bei der Gärbilanz mit Malat- $\text{U-}^{14}\text{C}$, bei der sich kein derartiger Überschuß an Lactat ergibt. Auch in den Versuchen von Alizade und Simon (1973) mit *Leuconostoc mesenteroides* war diese Lactatbildung aus endogenem Material immer deutlich sichtbar.

Im Unterschied zur Vergärung durch *Leuconostoc*, wobei aus L-Malat ausschließlich L-Lactat entsteht, liegt bei der Vergärung von L-Malat durch *Lactobacillus arabinosus* DL-Lactat vor. Es ist anzunehmen, daß diese Racemisierung auf die Wirkung der beiden in *Lactobacillus plantarum* anwesenden Milchsäuredehydrogenasen verschiedener Stereospezifität beruht (Dennis et al., 1964; Stetter und Kandler, 1973); denn nach den Befunden von Kaufmann et al. (1951) und Schütz (1973) bildet auch ein gereinigtes Malic enzyme aus *Lactobacillus plantarum* nur L-Lactat. Die Racemisierung muß also ein sekundärer Prozeß sein.

Unsere Versuche über den Malatabbau durch *Lactobacillus plantarum* bestätigen die frühere Annahme einer strikten Stöchiometrie und geben keinen Anhaltspunkt dafür, daß die entstehende Milchsäure weiter abgebaut werden kann, wie man aus den Daten von Sutton und Osmond (1972) wohl annehmen mußte. Daher erscheint uns die Verwendung von *Lactobacillus plantarum* zur Bestimmung der Isotopenverteilung in Malat unbekannter Markierung nach wie vor geeignet.

In einem Anwendungsbeispiel untersuchten wir die Verteilung von ^{14}C in Malat, das während der $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung in *Bryophyllum*blättern gebildet worden war. In

Übereinstimmung mit den früheren Befunden von Bradbeer et al. (1958) ergab sich für Fixierungszeiten von 10-300 sec. ein weitgehend konstanter Wert. Rund 75 % der Markierung finden sich in C_4 und rund 25 % in C_1 der Äpfelsäure.

Bei der Diskussion des Energiegewinnes beim Malatabbau muß man die unterschiedlichen bekannten Mechanismen auseinanderhalten. Im Falle des Malo-Lactat-Enzymes ist nach der bisherigen Kenntnis des Mechanismus keinerlei Möglichkeit für einen Energiegewinn erkennbar. Tatsächlich ergab auch die Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" bei *Leuconostoc mesenteroides*, der Malat ausschließlich mit dem Malo-Lactat-Enzym abbaut, keinen Hinweis für eine zusätzliche Produktion von Bakterienmasse durch zugesetztes Malat. Hinsichtlich des Mechanismus des Malatabbaues muß man aber zwei Möglichkeiten unterscheiden, und zwar den Abbau mit dem Malo-Lactat-Enzym und den Abbau mit dem Malatenzym.

Wenn Malat mit Hilfe des Malatenzymes abgebaut wird, wobei freies Pyruvat als Zwischenprodukt auftritt, scheint ein Energiegewinn vermutlich durch phosphoroklastische Spaltung des Pyruvates möglich zu sein, denn London et al. (1971a), London und Meyer (1970) und Schütz und Radler (1974) hatten bei *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus casei* nach Adaptation Wachstum auf Malat beobachtet.

In den hier beschriebenen Versuchen ergab sich ein erhöhter Zuwachs an Bakterienmasse bei mehreren Stämmen von Streptobakterien, wenn der Nährboden neben geringen, begrenzenden Mengen an Glucose auch Malat enthielt. Die Y_{Malat} -Werte lagen weit unter 10 (2,5 - 3,5), so daß höchstens ein Bruchteil eines Moles ATP pro Mol verbrauchten Malats entstanden sein könnte. Der Mechanismus der Energiegewinnung beim Malatabbau durch Streptobakterien bedarf allerdings noch weiterer eingehender Untersuchungen.

II. Der Einfluß von Sauerstoff auf die Gärprodukte und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" bei Stämmen von Leuconostoc.

Schon Johnson und McClekey (1957, 1958) hatten gefunden, daß einige Stämme von *Leuconostoc mesenteroides* unter aeroben Bedingungen pro Mol produziertem CO_2 ein Mol Sauerstoff verbrauchten und dann als C-2-Körper statt Äthanol Acetat ins Gärmedium abschieden.

Aber auch Stämme aller anderer Arten von *Leuconostoc* sind mehr oder weniger in der Lage, Sauerstoff zu verbrauchen und Acetat zu bilden (siehe Tabelle 19) und führen unter aeroben Bedingungen zu erhöhten Y_{Glucose} -Werten. Unter der Annahme, daß Y_{ATP} konstant ist, bedeutet dies aerob eine erheblich verbesserte Energieauswertung. Die einzige Ausnahme bildet der Stamm *Leuconostoc mesenteroides* 12291.

Die schon von Johnson und McCleskey (1957, 1958) theoretisch erwogene Möglichkeit der ATP-Bildung bei der Spaltung von Acetylphosphat in freie Essigsäure bei der aeroben Vergärung von Glucose durch *Leuconostoc mesenteroides* war bisher nie bewiesen worden. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse der Bestimmung des "molaren ökonomischen Koeffizienten" zeigen, ist sie tatsächlich verwirklicht.

Besonders auffällig war das Verhalten von *Leuconostoc paramesenteroides* 883, der einerseits fast ausschließlich Acetat und nur wenig Milchsäure bildete, andererseits aber einen besonders hohen Y_{Glucose} -Wert aufwies, der für die Bildung von 3 Mol ATP pro Mol Glucose sprach.

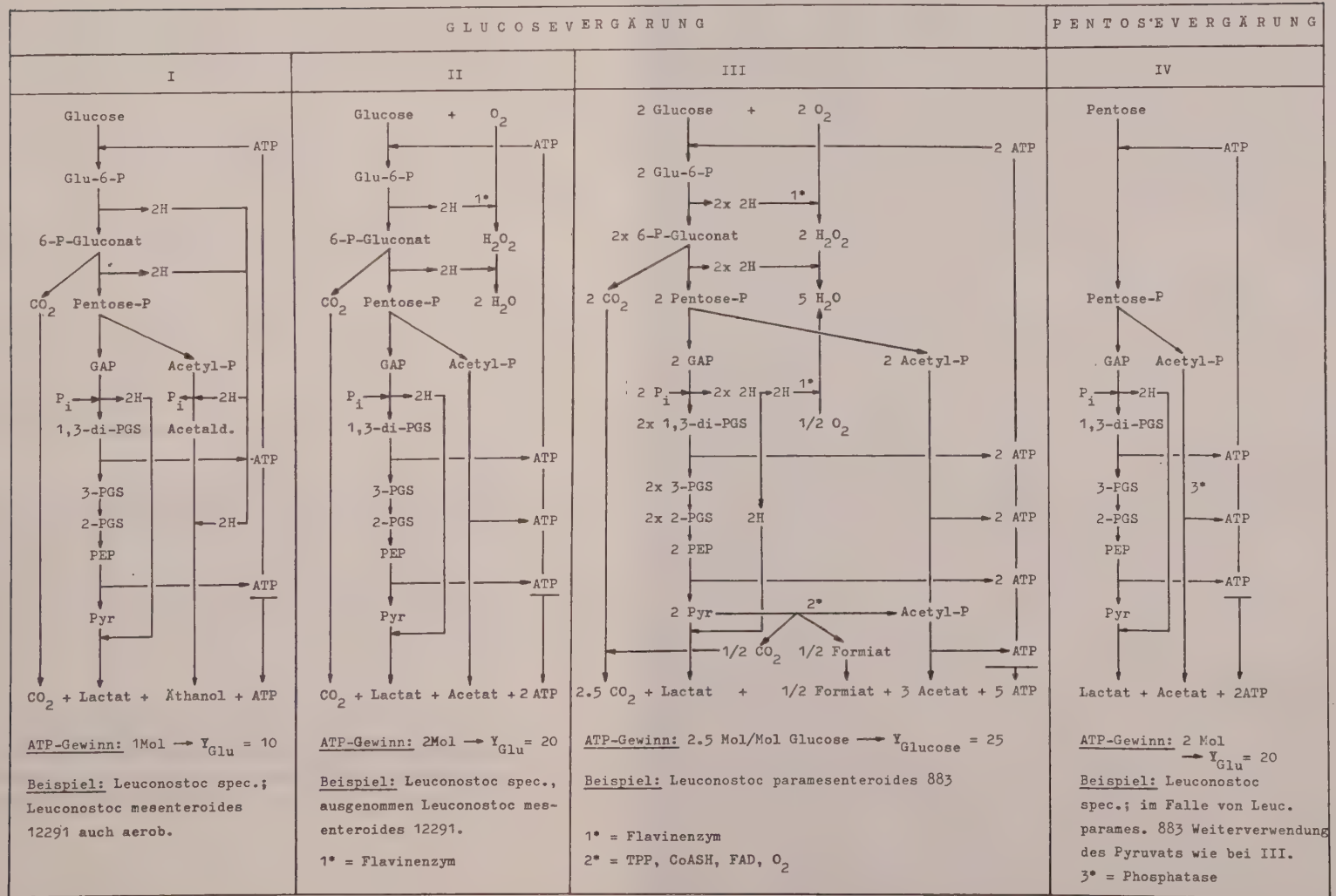
Die Untersuchung der Gärbilanz unter aeroben Bedingungen mit Hilfe positionsmarkierter Glucosen ergab, daß dieser Stamm nicht nur das aus C_2 und C_3 der Glucose stammende

Acetylphosphat zu Acetat spaltet, sondern auch den größten Teil des Pyruvats durch phosphoroklastische Spaltung zu Formiat bzw. CO_2 und Acetat spaltet. Die phosphoroklastische Spaltung und damit die Bildung von ATP aus C_5 und C_6 der Glucose kommt, wie entsprechende Versuche mit Glucose- $6\text{-}^{14}\text{C}$ zeigten, auch bei anderen Stämmen vor, ist aber innerhalb der von uns untersuchten Arten nur bei *Leuconostoc paramesenteroides* 883 in großem Umfang verwirklicht. Unter aeroben Bedingungen liefern diese Stämme aus Glucose auch 2 Mol ATP, wie das bei Pentosen auch anaerob der Fall ist, weil dort das Acetyl-Phosphat nicht zum Ausgleich der Redox-potentiale nötig ist und zu Acetat gespalten werden kann.

Eine Übersicht über die Heterofermentation und den dabei sich ergebenden Energiebilanzen zeigt das folgende Schema.

SCHEMA DER HETEROFERMENTIERENDEN MILCHSÄUREGÄRUNG

FÜR ANAEROBE UND AEROBE BEDINGUNGEN



E. Zusammenfassung

Bei *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactobacillus plantarum* wurde der Malatabbau und dessen Einfluß auf die Glucosevergärung und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" untersucht.

Außerdem wurde der Einfluß von Sauerstoff auf die Gärungsbilanz und den "molaren ökonomischen Koeffizienten" der Glucosevergärung bei *Leuconostoc* und einigen *Lactobacillen* bestimmt.

1. Es konnte gezeigt werden, daß bei *Leuconostoc* weder die Glucosevergärung durch Malat, noch die Malatvergärung durch Glucose beeinflusst wird. In Anwesenheit von Malat läuft mit Glucose eine normale heterofermentative Milchsäuregärung ab, wobei aus C_1 der Glucose CO_2 ,

aus C_2 und C_3 Äthanol und aus C_4 , C_5 und C_6 Milchsäure entsteht. Bei der Vergärung von Malat wird C_4 zu CO_2 und die restlichen C-Atome werden zu L-Milchsäure umgesetzt.

2. Die Malatvergärung ist innerhalb der Gattung *Leuconostoc* auf die Art *Leuconostoc mesenteroides* beschränkt.
3. Der Malatabbau durch *Lactobacillus plantarum* führt auch bei unterschiedlichen Abbaubedingungen streng stöchiometrisch zu CO_2 und DL-Lactat. Auch verlängerte Inkubationszeiten ergeben keine Veränderung dieser Stöchiometrie.
4. Malat verändert die Energiebilanz der Glucosevergärung durch *Leuconostoc* und Streptobakterien nicht, kann jedoch von einigen Streptobakterien auch in Anwesenheit von geringen Mengen Glucose zur Energiegewinnung (vermehrtes Wachstum) verwendet werden.
5. Aerobe Bedingungen bewirken bei den meisten Stämmen von *Leuconostoc* eine Verbesserung der Energiebilanz um den Faktor 2, da in diesem Fall Acetylphosphat statt zu Äthanol reduziert zu werden zu Acetat dephosphoryliert wird, wobei ein zusätzliches Mol ATP erzeugt wird.
6. Der Stamm *Leuconostoc paramesenteroides* 883 weist einen besonders hohen $Y_{Glucose}$ -Wert (30 g/mol) auf, was auf einen Energiegewinn von 3 Mol ATP pro Mol verbrauchter Glucose hinweist. Außerdem bildet dieser Stamm erheblich weniger als ein Mol Milchsäure und wesentlich mehr als 2 Mol Acetat pro Mol Glucose.

7. Die Vergärung von Glucose-6-¹⁴C mit verschiedenen Leuconostocstämmen zeigte, daß die Fähigkeit der phosphoroklastischen Pyruvatspaltung weit verbreitet ist, aber nur in sehr geringem Umfang abläuft. Stamm 883 stellt durch die starke Benützung dieser Abbaumöglichkeit eine Ausnahme dar.

E. Literaturverzeichnis

- Abo-Elnaga, I.G. und Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. I. Das Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Zbl.Bakt.II, 119, 1-36 (1965).
- Alizade, M.A. und Simon, H.: Zum Mechanismus und zur Kompartimentierung der L- und D-Lactatbildung aus L-Malat bzw. D-Glucose in *Leuconostoc mesenteroides*. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 163-168 (1973).
- Bauchop, T. and Elsdon, S.R.: The growth of microorganisms in relation to their energy supply. J.Gen.Microbiol. 23, 457-469 (1960).
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. und Stork, H.: Glucosebestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, in: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer), 1163-1168, Verlag Chemie (1970).

- Bernt, E. und Gutmann, I.: Äthanol: Bestimmung mit Alkohol-dehydrogenase und NAD^+ in: Methoden der enzymatischen Analyse II. (H.U.Bergmeyer), 1457-1460, Verlag Chemie (1970).
- Bradbeer, J.W., Ranson, S.L. and Stiller, M.L.: Malate synthesis in Crassulacean leaves. I. The distribution of ^{14}C in malate of leaves exposed to $^{14}\text{CO}_2$ in the dark. Plant Physiol. 33, 66-70 (1958).
- Brown, J.P.: Anomalous anaerobic growth yields of Lactobacillus casei strain 103 in complex medium. Appl. Microbiol. 16, 805-807 (1968).
- Deal, S.J. and Lichstein, H.C.: Malic enzyme induction by lactic acid bacteria. I. A method for the study of nutritional interactions. Canad.J.Microbiol. 7, 153-161 (1961).
- DeMan, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J.Appl.Bact.23, 130-135 (1960).
- DeMoss, R.D., Bard, R.C. and Gunsalus, I.C.: The mechanism of the heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation. J.Bacteriol.62, 499-511 (1951).
- DeMoss, R.D. and Gibbs, M.: 6-Phosphogluconate dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides. J.Bacteriol.70, 730-734 (1955).
- Dennis, D., Reichlin, M. and Kaplan, N.O.: Lactic acid racemisation. Ann.N.Y.Acad.Sci. 119, 868-876 (1965).

- Dirar, H. and Collins, E.B.: Endproducts, Fermentation Balances and Molar Growth Yields of Homofermentative Lactobacilli. J.Gen.Microbiol. 73, 233-238 (1972).
- Doelle, H.W.: Influence of Carboxylic Acides on the Stereo-specific Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent and Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Lactate Dehydrogenases of *Leuconostoc mesenteroides*. J.Bacteriol.108, 1290-1295 (1971).
- Fuck, E. und Radler, F.: Äpfelsäurestoffwechsel bei *Saccharomyces*. I. Der anaerobe Äpfelsäureabbau bei *Saccharomyces cerevisiae*. Arch.Mikrobiol. 87, 149-164 (1972).
- Gunsalus, I.C. and Gibbs, M.: The heterolactic fermentation. II. Position of ^{14}C in the products of glucose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. J.Biol. Chem. 194, 871-875 (1952).
- Gunsalus, I.C. and Shuster, C.W.: Energy-Yielding Metabolism in Bacteria. In: The Bacteria, Vol.II (I.C.Gunsalus and R.Y.Stanier) Academic Press, New York and London, (1961).
- Hatch, M.D.: Synthesis of L-malate-4- ^{14}C and determination of label in the C-4 carboxyl of L-malate. Anal.Biochem. 47, 174-183 (1972).
- Holz, G. und Bergmeyer, H.U.: Acetat: Bestimmung mit Acetatskinase und Hydroxylamin in: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer), 1486-1490, Verlag Chemie (1970).
- Horost, H.J.: L-Lactatbestimmung in: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer) 1425-1429, Verlag Chemie (1970).

- Horost, H.J.: Bestimmung von L-Malat mit Malatdehydrogenase und NAD in: Methoden der enzymatischen Analyse II, 1556-1559, Verlag Chemie (1970).
- Hurwitz, J.: Pentosephosphate Cleavage by *Leuconostoc mesenteroides*. Biochim.Biophys.Acta 28, 599-602 (1958).
- Johnson, M.K. and McCleskey, C.S.: Studies of the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*. J.Bacteriol.74, 22-25 (1957).
- Johnson, M.K. and McCleskey, C.S.: Further studies on the aerobic metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*. J.Bacteriol. 75, 98-101 (1958).
- Jolchine, G.: Sur la distribution du ^{14}C dans les molecules d'acide malique synthetisees par fixation de $^{14}\text{CO}_2$ dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum*. Berger.Bull.Soc.Chim.Biol.41, 227-234 (1959).
- Kadsuki, H., Takeo, K., Kamedo, K. and Tanaka, S.: Existence of the two malic enzymes in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys.Res.Commun.27, 331-336 (1967).
- Kandler, O.: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Atmungsstoffwechsel und Wachstumsvorgängen bei in vitro kultivierten Maiswurzeln. Z.Naturforsch.5b, 203-211 (1950).
- Kandler, O., Winter, J. und Stetter, K.O.: Zur Frage der Beeinflussung der Glucosevergärung durch L-Malat bei *Leuconostoc mesenteroides*. Arch.Microbiol.90, 65-75 (1973).

- Kaufmann, S., Korkes, S. and Del Campillo, A.: Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. V. Further study of the malic enzyme of *Lactobacillus arabinosus*. *J.Biol.Chem.* 192, 301-314 (1951).
- Korkes, S. and Ochoa, S.: Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J.Biol.Chem.* 167, 463-464 (1948).
- Korkes, S., Del Campillo, A. and Ochoa, S.: IV. Isolation and properties of an adaptive malic enzyme from *Lactobacillus arabinosus*. *J.Biol.Chem.* 187, 891-905 (1950).
- Kunkee, R.E.: Malo-lactic fermentation. *Advanc.Appl.Microbiol.* 9, 235-279 (1967).
- London, J. and Meyer, E.Y.: Malate utilisation by a group D *Streptococcus*: Physiological properties and purification of an inducible malic enzyme. *J.Bacteriol.* 98, 705-711 (1969a).
- London, J. and Meyer, E.Y.: Malate utilisation by a group D *Streptococcus*: II. Evidence for allosteric inhibition of an inducible malate dehydrogenase (decarboxylating) by ATP and glycolytic intermediate products. *Biochim. Biophys.Acta (Amst.)* 178, 205-212 (1969b).
- London, J. and Meyer, E.Y.: Malate utilisation by a group D *Streptococcus*: Regulation of malic enzyme synthesis by an inducible malate permease. *J.Bacteriol.* 102, 130-137 (1970).
- London, J., Meyer, E.Y. and Kulczyk, S.R.: Allosteric control of a *Lactobacillus* malic enzyme by two glycolytic intermediate products. *Biochim.Biophys.Acta (Amst.)* 212, 512-514 (1970).

- London, J., Meyer, E.Y. and Kolczyk, S.R.: Comparative biochemical and immunological study of malic enzyme from two species of lactic acid bacteria: Evolutionary implication. J.Bact.106, 126-137 (1971a)
- London, J., Meyer, E.Y. and Kulczyk, S.R.: Detection of Relationships between Streptococcus faecalis and Lactobacillus casei by immunological studies with two forms of malic enzyme. J.Bact.108, 196-201 (1971b)
- Mayer, K. and Temperli, H.: The metabolism of L-malate and other compounds by Schizosaccharomyces pombe. Arch.Microbiol. 46, 321-328 (1963).
- Mickelson, M.N.: Glucose Degradation, Molar Growth Yields, and Evidence for Oxidative Phosphorylation in Streptococcus agalactiae. J.Bat. 109, 96-105 (1972).
- Monod, J.: Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Hermann, Paris (1942).
- Moustafa, H.H. and Collins, E.B.: Molar growth yields of certain lactic acid bacteria as influenced by autolysis. J.Bact. 96, 117-125 (1968a).
- Neish, A.C.: Analytical methods for bacterial fermentations. N.R.C. No. 2952 Saskatoon (1952).
- Nossal, P.M.: The decarboxylation of malic acid by Lactobacillus arabinosus. Biochem.J.49, 407-413 (1951).

- Ochoa, S., Mehler, A.H. and Kornberg, A.J.: Reversible oxidative decarboxylation of malic acid. J.Biol. Chem.167, 871-872 (1947).
- Oxenburgh, M.H. and Snoswell, A.M.: Use of molar growth yields for the evaluation of energy producing pathways in *Lactobacillus plantarum*. J.Bacteriol.89, 913-914 (1965).
- Pasteur, L.: Etudes sur la biere. Ses maladies, causes qui le provoquent, procede pour la rendre malterables avec une theorie nouvelle de la fermentation. Paris: Masson & Cie (1876).
- Peynaud, E., Lafon-Lafourcade, S., Guimberteau, G. (presentee par Prevot, M.A.): Sur le diverses formes de l'acide lactique dans les milieux fermentes. C.R.Acad.Sci. (Paris) 263, 634-635 (1966).
- Peynaud, E., Lafon-Lafourcade, S., Guimberteau, G.: Sur la nature de l'acide lactique forme par les bacteries lactique isolees de vins. Rev.Ferment.Indust. Alimentaires T 22, 2, 64-66 (1967).
- Peynaud, E. (presentee par Prevot, A.R.): Mecanisme biochimique de la fermentation malolactique. C.R.Acad.Sci.(Paris) 267, 121-122 (1968a)
- Peynaud, E., Lafon-Lavourcade, S., Guimberteau, G.: Über den Mechanismus der Äpfelsäure-Milchsäure-Gärung. Mitteilungen. Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung 5, 343-348 (1968b).
- Pfeffer, W.: Über Election organischer Pflanzenstoffe. Jahresb. wiss.Bot. 28, 205-268 (1895).

- Radler, F.: Die mikrobiologischen Grundlagen des Säureabbaues im Wein. Zbl.Bakt., II.Abt. 120, 237-287 (1966).
- Radler, F., Schütz, M. und Doelle, H.W.: Die beim Abbau von L-Äpfelsäure durch Milchsäurebakterien entstehenden Isomeren der Milchsäure. Naturwissenschaften 57, 672 (1970)
- Schütz, M.: Die Isomeren der Milchsäure beim Abbau von L-Äpfelsäure durch Milchsäurebakterien. Diplomarbeit, Mainz (1969)
- Schütz, M.: Über das Malatenzym von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*. Dissertation, Mainz (1972).
- Schütz, M. und Radler, F.: Das "Malatenzym" von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*. Arch.Microbiol. 91, 183-202 (1973).
- Schütz, M. und Radler, F.: Das Vorkommen von Malatenzym und "Malo-Lactat-Enzym" bei verschiedenen Milchsäurebakterien. Arch.Microbiol. 96, 329-339 (1974).
- Senez, J.C.: Some considerations on the energetics of bacterial growth. Bacteriological Reviews 26, 95-107 (1962)
- Sharpe, M.E.: Taxonomy of the lactobacilli. Dairy Sci. Abstr.24, 109 (1962).
- Smalley, A.J., Jahrling, P. and Van Demark, P.J.: Molar growth yields as evidence for oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis* Strain 10Cl. J.Bact. 96, 1595-1600 (1968)
- Sokatch, J.T. and Gunsalus, I.C.: Aldonic acid metabolism. I. Pathway of carbon in an inducible gluconate fermentation by *Streptococcus faecalis*. J.Bact.73, 452-458 (1957).

- Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerengemischen bei Lactobacillen. Dissertation, München (1973).
- Stetter, K.O. und Kandler, O.: Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milchsäure bei Lactobacillen und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobacterium. Arch.Microbiol. 94, 221-247 (1973).
- Stouthamer, A.H.: Molar growth yields. In: Microbiological Methods. Ed. D.W.Ribbons and J.R.Norris, London: Academic Press (1968).
- Stouthamer, A.H.: Determination and Significance of molar growth yields. In: Methods in Microbiology, Vol.I, 629-663. Ed. by J.R.Norris and D.W.Ribbons. New York: Academic Press (1969).
- Sutton, B.G. and Osmond, C.B.: Dark Fixation of CO₂ by Crassulacean Plants: Evidence for a single carboxylation step. Plant Physiol. 50, 360-365 (1972).
- Van der Beck, E.G. and Stouthamer, A.H.: Oxidative Phosphorylation in intact Bacteria. Arch.Microbiol. 89, 327-339 (1973).
- Wood, W.A.: Fermentation of carbohydrates and related compounds. In: The Bacteria, Vol. II, ed.by I.C.Gunsalus and R.Y. Stanier, Academic Press New York and London (1961).
- Wiesenberger, E.: Die mikroanalytische Bestimmung von C-Methyl- und Acetylgruppen. Mikrochemie 33, 51 (1948).

Vorliegende Arbeit wurde am Institut für allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof.Dr.O.Kandler von 1971 bis 1974 angefertigt.

Herrn Prof.Dr.O.Kandler danke ich für die Anteilnahme an meiner Arbeit und für alle Unterstützung und wertvollen Hinweise.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Lebenslauf

Am 10. November 1947 wurde ich, Josef Winter, als Sohn des Landwirts Ulrich Winter und seiner Ehefrau Katharina, geb. Leissner in Nasnitz/Obpf. geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule Michelfeld und von 1958 bis 1967 das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Pegnitz/Ofr. Im Sommer 1967 bestand ich das Abitur.

Vom 1.10.1967 bis 31.10.1967 war ich zum Wehrdienst nach Bayreuth einberufen.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Chemie und Biologie für das Höhere Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Herbst 1971 legte ich die Prüfung für das Höhere Lehramt an Gymnasien ab.

Im Dezember 1971 begann ich unter der Anleitung von Prof. Dr.O.Kandler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit. Von April 1972 bis Juni 1972 hatte ich die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, von Juli 1972 bis einschließlich August 1973 erhielt ich eine Ausbildungsbeihilfe nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Seit September 1973 bin ich wissenschaftlicher Angestellter an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

